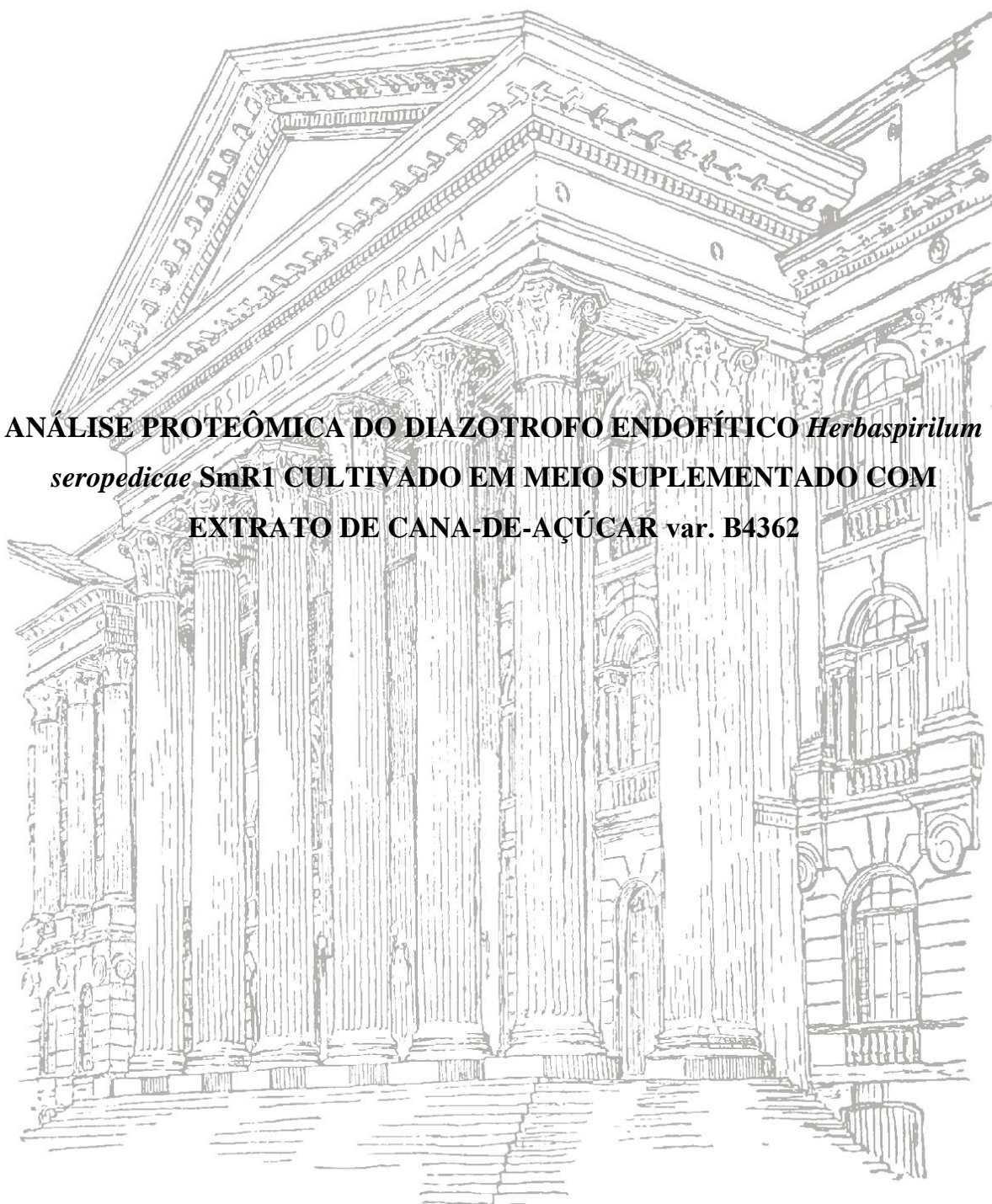


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIO APARECIDO CORDEIRO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO DIAZOTROFO ENDOFÍTICO *Herbaspirillum*
seropedicae SmR1 CULTIVADO EM MEIO SUPLEMENTADO COM
EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR var. B4362**



**CURITIBA
2013**

FABIO APARECIDO CORDEIRO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO DIAZOTROFO ENDOFÍTICO *Herbaspirillum*
seropedicae SmR1 CULTIVADO EM MEIO SUPLEMENTADO COM
EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR var. B4362**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências:
Bioquímica, Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, para
obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

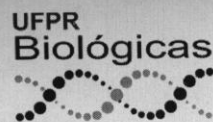
Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de
Souza

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro

**CURITIBA
2013**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em
Ciências – Bioquímica – 48 anos



DECLARAÇÃO

Declaro que **FABIO APARECIDO CORDEIRO**, em data de 09 de agosto de 2013 defendeu a tese de doutorado intitulada: “**Análise proteômica do diazotrofo endofítico *Herbaspirillum seropedicae* SmRI cultivado em meio suplementado com extrato de cana-de-açúcar var. B4362**” e que cumpriu os créditos exigidos pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Bioquímica da UFPR, Informamos ainda que o diploma de Doutor prossegue em andamento.

Curitiba, 02 de Setembro de 2013.



Irene Luzia Forghieri Rosa
Matr. 94773

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza pela paciência e a maneira profissional com que lidou com minhas limitações e também por seu exemplo de total dedicação à vida científica e de superação de dificuldades, assim como por suas ideias e críticas.

Agradeço à professora Dr^a Rose Adele Monteiro pela ajuda, compreensão e atenção, sendo digna de nota a preciosa ajuda na discussão dos resultados no artigo sendo-lhe muito grato.

O meu muito obrigado ao professor Dr. Luciano Huergo pela grande ajuda que me foi dispensada sempre quando precisei referente às questões técnicas do dia a dia laboratorial, assim como boas ideias na correção da tese e do artigo.

Minha sincera gratidão à professora Dr^a. Marina Kadowaki pela incrível disponibilidade e atenção ao me ajudar com o que foi necessário no início do trabalho quando aqui estive.

À professora Dr^a Dayane Alberton pela sua amizade, conselhos e convivência durante o tempo que dividimos o laboratório.

Agradeço à Dr^a. Luíza Araújo pela leitura, sugestões e correção dos projetos de pesquisa que originaram essa tese, sou muito grato.

Agradeço ao professor Dr. Fabio de Oliveira Pedrosa por ser um exemplo de dedicação e por ter se mostrado sempre solícito para sugestões de realização do presente trabalho.

À professora Dr^a. Marise Fonseca dos Santos que bondosamente aceitou compor a banca.

Aos demais professores do laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e do Departamento de Bioquímica da UFPR.

Aos colegas de laboratório pela ajuda e disposição em ajudar e pelos importantes momentos de conversas descontraídas nesse longo do tempo que ficamos juntos.

Aos servidores do Departamento: Dona Ju, Dona Marilza, Roseli Prado e Valter pelo auxílio indispensável em suas respectivas tarefas.

Aos meus pais Adão e Maria e avó Luzia (*in memorian*) pelo exemplo de retidão, pelo apoio incondicional e por sempre me apoiarem nos momentos de maior dificuldade. Também a minhas irmãs Ana Paula e Ana Lúcia pela alegria de me sentir querido por elas.

À Elissa pelo companheirismo, atenção e amor dispensados durante os períodos finais do doutorado e por sempre ter uma palavra de alento quando precisei. Sou muito grato pelos momentos que passamos juntos e que contribuíram direta ou indiretamente para chegar até aqui.

À coordenação de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular e a todas as Instituições Financiadoras, particularmente ao INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio financeiro e a CAPES/REUNI e CNPq pela bolsa de estudos.

E por último, mas não menos importante, agradeço a Deus pela vida, saúde e pelas bênçãos concedidas para que eu chegasse a essa etapa de minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	2
2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	3
2.3 CANA-DE-AÇÚCAR.....	4
2.4 INTERAÇÃO PLANTA BACTÉRIA.....	8
2.5 COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA POR <i>Herbaspirillum</i>	12
2.6 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR <i>Herbaspirillum</i>	15
2.7 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	18
2.7.1 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	20
2.7.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	21
2.8 ANÁLISE PROTEÔMICA NO ESTUDO DA INTERAÇÃO PLANTA BACTÉRIA.....	24
3. JUSTIFICATIVAS.....	27
4. OBJETIVOS.....	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1 ESTIRPE UTILIZADA.....	30
5.2 MEIOS DE CULTIVO.....	30
5.3 PREPARO DO EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	31

5.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	32
5.5 PREPARO DAS CÉLULAS PARA A ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	32
5.6 ISOELETROFOCALIZAÇÃO.....	33
5.7 EQUILÍBRIO DAS TIRAS DE GRADIENTE DE pH IMOBILIZADO.....	34
5.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE).....	34
5.9 VISUALIZAÇÃO DOS GÉIS.....	35
5.10 CAPTURA DAS IMAGENS.....	36
5.11 ANÁLISE DOS GÉIS.....	36
5.12 RETIRADA DE PROTEÍNAS DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS.....	37
5.13 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA.....	37
5.14 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DA MASSA	38
5.15 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	39
5.16 EXTRAÇÃO DE RNA.....	40
5.17 SÍNTESE DE cDNA.....	41
5.18 ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL POR qRT-PCR.....	42
5.19 ENSAIOS DE ADESÃO DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> ÀS RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6.1 PERFIL DE CRESCIMENTO DE <i>H. seropedicae</i> EM EXTRATO DE CANA-DE- AÇÚCAR.....	45
6.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DE <i>H. seropedicae</i> CULTIVADO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE EXTRATO DE CANA-DE- AÇÚCAR.....	46

6.3 ANÁLISE DOS ELETROFORETOGRAMAS BI-DIMENSIONAIS.....	48
6.4 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DE <i>H. seropedicae</i>	51
6.4.1 PROTEÍNAS RELACIONADAS COM VIAS METABÓLICAS.....	56
6.4.2 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.....	63
6.5 ANÁLISE POR PCR QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 NA PRESENÇA DE 5% DE EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	67
6.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS À NARINGENINA FRENTE AO EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	71
7. CONCLUSÕES.....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: VIA DE COLONIZAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR POR <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	13
FIGURA 2: FASES DE PREPARO DA AMOSTRA E DE GÉIS BIDIMENSIONAIS (SDS-PAGE).....	35
FIGURA 3: ETAPAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	40
FIGURA 4: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA.....	41
FIGURA 5: CURVAS DE CRESCIMENTO DE <i>H. seropedicae</i> CULTIVADO NA AUSÊNCIA (C) E NA PRESENÇA (SE) DE 5% DE EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	45
FIGURA 6: GÉIS BIDIMENSIONAIS REPRESENTATIVOS OBTIDOS DAS CULTURAS DE CÉLULAS CULTIVADAS NA PRESENÇA (SE) E AUSÊNCIA (C) DO EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	47
FIGURA 7: GÉIS BIDIMENSIONAIS ILUSTRATIVOS DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE <i>H. seropedicae</i> CULTIVADOS NA AUSÊNCIA (C) E PRESENÇA (SE) DE 5% DE EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	49
FIGURA 8: ZOOM DOS PONTOS PROTÉICOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.....	50
FIGURA 9: PERCENTUAIS DOS VOLUMES DAS BANDAS PROTÉICAS (SPOTS) CALCULADAS A PARTIR DOS GÉIS 2D DE CADA CONDIÇÃO USANDO O SOFTWARE Imagemaster 6.0	51
FIGURA 10: GEL DE AGAROSE 1% DO RNA TOTAL DE <i>H. seropedicae</i> CULTIVADO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	68

FIGURA 11: QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE mRNA POR qRT-PCR DOS GENES DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DE <i>H. seropedicae</i> EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO AO EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	69
FIGURA 12: ENSAIO DE ADESÃO DA ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> SMR1 E ESTIRPE MUTANTE <i>rfbB</i> RAMEB-B A RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR B-4362.....	70
FIGURA 13: EFEITO DO EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA EXPRESSÃO DE GENES DE <i>H. seropedicae</i> REGULADOS POR NARINGENINA.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LOG DO NÚMERO DE <i>Herbaspirillum spp.</i> POR GRAMA DE PESO SECO COLONIZANDO RAÍZES E CAULES DE DUAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (SP 79-2312 E SP 70-1143), CULTIVADAS COM E SEM FERTILIZANTES NITROGENADOS.....	11
TABELA 2: COMPOSIÇÃO DO MEIO JNFB-MALATO.....	30
TABELA 3: OLIGONUCLEOTÍDEOS USADOS NA ANÁLISE DE qRT-PCR DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>H. seropedicae</i>	43
TABELA 4: IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. seropedicae</i> CULTIVADA NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	52
TABELA 5: DADOS SUPLEMENTARES DA IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	54
TABELA 6: COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	60
TABELA 7: IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE <i>H. seropedicae</i> REGULADOS POR NARINGENINA.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl – Microlitro
ATP - adenosina trifosfato
2D - Bidimensional
2D-PAGE - eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
BSA - Albumina de soro bovino
CHAPS - 3-[(3-colamidopropil)-dimetil amônio]-propano-sulfonato
Da - Dalton
D.O.₆₀₀ – Absorbância em 600 nanômetros
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
DTT – Ditioneitol
ESI - Ionização por eletrospray
g - Grama
ha - hectare
h - Hora
HCCA - Ácido α-ciano-4-hidróxi-cinâmico
IEF - Focalização isoeletrica
IPG - Gradiente de pH imobilizado
kDa - Quilodalton
kV - Quilovolts
kVh – Quilovolt/ hora
m/z - Razão massa carga
mA - Miliampére
MALDI – Dessorção e ionização a *laser* assistida por matriz
mg - Miligrama
min - Minuto
ml - Mililitro
mmol/L – Milimol por litro
MM - Massa molecular
mRNA - Ácido Ribonucléico mensageiro
MS - Espectrometria de massa
MS/MS - Espectrometria de massa em sequência.
ng - Nanograma
ORF – Janela de leitura aberta (*Open reading frames*)
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
PGPR- Rizobactérias promotoras do crescimento da planta
pI - Ponto isoeletrico
PMF - Impressão digital de peptídeos (*peptide mass fingerprinting*)
PMSF - Fluoreto de fenil-metil-sulfonilo

ppm – Partes por milhão

qRT-PCR – Reação da polimerase em cadeia quantitativo em tempo real

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio

Spot – Banda proteica

Spot ID - Identificação das bandas no gel

TCA - Ácido tricloroacético

TFA - Ácido trifluoracético

ToF - Tempo de voo

Vhr - Voltagem/hora

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica e endofítica, encontrada em associação com gramíneas de grande importância para a alimentação humana e animal como o milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*), e também algumas espécies tropicais como a bananeira (*Musa spp*) e o abacaxizeiro (*Ananas comosus*). O *H. seropedicae* é uma bactéria promotora do crescimento vegetal (PGPR-Plant Growth Promoter Rhizobacteria), sendo, portanto utilizada como biofertilizante. As análises da expressão gênica através dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) ou dos níveis protéicos, são ferramentas importantíssimas para se compreender o funcionamento dos sistemas biológicos e a interação entre plantas e bactérias. Na análise proteômica, um conjunto de técnicas permite a análise e identificação de proteínas diferencialmente expressas em condições distintas. Usando tais técnicas é possível traçar um perfil da interação entre plantas e bactérias já que os mecanismos moleculares da interação entre cana-de-açúcar e *Herbaspirillum seropedicae* não são entendidos inteiramente. Neste trabalho utilizou-se a técnica de eletroforese 2D-PAGE e espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF para separar e identificar as proteínas de *H. seropedicae* diferencialmente expressas na fase exponencial de crescimento na presença de 5% de extrato de cana-de-açúcar. As proteínas diferencialmente expressas foram validadas pela técnica de qRT-PCR. Um total de 16 proteínas diferencialmente expressas por *H. seropedicae* foram identificadas (1 exclusivamente expressa, 7 ausentes, 5 com expressão aumentada e 3 com expressão diminuída) na presença do extrato de cana-de-açúcar. Assim o extrato de cana foi capaz de induzir e reprimir genes específicos de *H. seropedicae*. As proteínas diferencialmente expressas sugerem que a exposição ao extrato de cana-de-açúcar induz mudanças metabólicas e adaptações em *H. seropedicae* presumivelmente em preparação para estabelecer uma interação com a planta.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic diazotrophic bacteria found in association with grasses of great importance for human and animal food such as maize (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa*), sorghum (*Sorghum bicolor*), sugarcane (*Saccharum* interspecific hybrids), and also some tropical species such as banana (*Musa spp*) and pineapple (*Ananas comosus*). *Herbaspirillum seropedicae* is a Plant Growth Promoter Rhizobacteria (PGPR) and therefore used as biofertilizer. The analysis of gene expression through the levels of messenger RNA (mRNA) and protein levels, are important tools for understanding the functioning of biological systems and the interaction between plant and bacteria. In proteomic analysis there is a set of techniques that allows the analysis and identification of differentially expressed proteins in different conditions of comparable systems. Mass spectrometry allows identification of these proteins and thus have potential to study a profile the interaction between plants and bacteria. The molecular mechanisms that mediate plant- *H. seropedicae* interaction are poorly understood. In this work, 2D-PAGE electrophoresis and MALDI-ToF mass spectrometry were used to separate and identify *H. seropedicae* proteins differentially expressed at the exponential phase of growth in the presence of 5% sugarcane extract. The differentially expressed proteins were validated by RT qPCR. A total of 16 differential proteins were identified (1 exclusively expressed, 7 absent, 5 up- and 3 down-regulated) in the presence of 5% sugarcane extract were identified, thus the host extract is able to induce and repress specific genes of *H. seropedicae*. The differentially expressed proteins suggest that exposure to sugarcane extract induced metabolic changes and adaptations in *H. seropedicae* presumably in preparation to establish interaction with the plant.

ANÁLISE PROTEÔMICA DO DIAZOTROFO ENDOFÍTICO *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 CULTIVADO EM MEIO SUPLEMENTADO COM EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR var. B4362

1 – INTRODUÇÃO

A bactéria endofítica e diazotrófica, *Herbaspirillum seropedicae*, desempenha um papel de destaque e de grande importância na relação benéfica com a cana-de-açúcar. Já foi encontrada também em associação com várias gramíneas de grande importância para a alimentação humana e animal. O *H. seropedicae* é uma bactéria promotora do crescimento vegetal (PGPR-Plant Growth Promoter Rhizobacteria) (MONTEIRO *et al.*, 2012). Além da fixação biológica de nitrogênio, bactérias promotoras de crescimento vegetal podem ajudar a planta evitar ou superar parcialmente uma variedade de estresses ambientais, bem como estimular o desenvolvimento da planta (SPAEPEN *et al.*, 2007). O entendimento da relação benéfica estabelecida entre *H. seropedicae* e a cana-de-açúcar não é satisfatoriamente compreendida. As análises da expressão gênica através dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) ou dos níveis protéicos, são ferramentas importantíssimas para se compreender o funcionamento dos sistemas biológicos e da interação entre plantas e bactérias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum* pertence à classe Betaproteobacteria e compreende 14 espécies. Embora uma proporção considerável dessas 14 espécies seja rizosférica e epifítica, as espécies associadas às plantas se notabilizam pela sua capacidade de colonizar os tecidos internos da planta que o hospeda (revisado por MONTEIRO *et al.*, 2012). Algumas espécies de *Herbaspirillum* fixam N₂ atmosférico em condições microaeróbicas

(sendo assim diazotróficos), e tem predileção pelos ácidos orgânicos como fontes de carbono crescendo bem sob condições de fixação de nitrogênio ou não (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1996). As espécies que receberam maior atenção da comunidade científica são *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1, um mutante espontâneo da estirpe Z78 (ATCC 35893) resistente à estreptomicina e, originalmente isolada do sorgo (BALDANI *et al.*, 1996), e que teve seu genoma recentemente sequenciado e anotado (PEDROSA *et al.*, 2011), e a estirpe Z67 (ATCC 35892), que foi isolada de arroz (BALDANI *et al.*, 1986).

Originalmente, Baldani *et al.*, (1986) isolaram algumas estirpes bacterianas cuja morfologia, condições de crescimento, conteúdo de GC no DNA e outras características não se igualaram a qualquer espécie de bactérias descritas à época. Essas bactérias foram denominadas como um novo gênero *Herbaspirillum* (*Herba* = planta herbácea com sementes que não produz tecidos lenhosos persistentes; *spirillum* = pequeno espiral; *Herbaspirillum*= bactéria em formato de pequeno espiral de plantas herbáceas), cujos membros são gram-negativos, vibrióides, algumas vezes helicoidais e possuem um ou três flagelos polares. Crescem melhor em ácidos dicarboxílicos, gluconato, glucose e manitol, fixam N₂ em uma faixa de pH de 5,3-8,0 (BALDANI *et al.*, 1986; 1992; URETA *et al.*, 1995). *Herbaspirillum* spp. cresce e fixa nitrogênio em pO₂ relativamente altas (3% na fase gasosa) quando comparado com *Azospirillum* spp. (2%) (BALDANI *et al.*, 1986; FU & BURRIS, 1989). Também *H. seropedicae* expressa nitrato redutase e é capaz de crescer, mas não fixar nitrogênio na presença de nitrogênio fixado (extrato de levedura com NO₃⁻) (BALDANI *et al.*, 1986). A assimilação de nitrato envolve o transporte de nitrato para a célula e a redução de nitrato para amônio por ação sequencial da nitrato redutase e nitrito redutase (NO₃⁻ → NO₂⁻ → NH₄⁺).

Espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* colonizam cana-de-açúcar endofiticamente. Um alto número de células de *Herbaspirillum seropedicae* foi detectado em muitas variedades de cana-de-açúcar coletadas no Brasil, Austrália e Índia (BALDANI et al., 1996; BODDEY et al., 1998). Esta bactéria foi também isolada de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) (BALDANI et al., 1986), banana (*Musa spp.*) e abacaxi (*Ananas spp.*) (WEBER et al., 2001).

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio

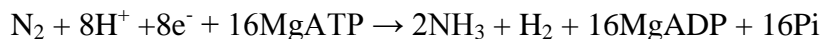
A redução do nitrogênio atmosférico (fixação de nitrogênio) é um processo importante para a manutenção do ciclo do nitrogênio, pois devolve ao solo o nitrogênio perdido durante o processo de denitrificação, o qual libera o nitrogênio para a atmosfera na forma de N_2 . Sendo assim, a fixação biológica de nitrogênio atua compensando, através da devolução de nitrogênio ao solo, as perdas geradas pelo processo de denitrificação (MARTINEZ-ARGUDO et al. 2005).

A reação de redução de nitrogênio atmosférico à amônia requer uma energia de ativação muito alta, o que torna sua ocorrência de forma espontânea na ausência de catalisadores adequados, praticamente impossível. Na indústria, o processo de fixação de nitrogênio desenvolvido por Haber-Bosch é dependente de altas temperaturas (entre 400°C e 600°C), pressões acima de 300 atm e de catalisadores a base de ferro que combinam nitrogênio e hidrogênio para formação de compostos químicos nitrogenados e destinados à produção de fertilizantes (KIM & REES, 1994).

No processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), microrganismos procariotos diazotróficos, ou fixadores de nitrogênio, realizam a conversão do nitrogênio atmosférico

(N₂) à amônia (NH₃) através do complexo enzimático da nitrogenase. A amônia resultante do processo de FBN é disponibilizada para as plantas por meio de associações entre a bactéria fixadora e a planta (BURRIS, 1991). O complexo da enzima nitrogenase é formado pela proteína Ferro e pela proteína Ferro-Molibdênio (FeMo). A transferência de elétrons através do complexo da nitrogenase é iniciada pela redução da proteína Ferro por uma ferredoxina ou flavodoxina, então os elétrons são transferidos para a proteína FeMo, processo este que é dependente da hidrólise de MgATP. Como somente um elétron é transferido para cada duas moléculas de MgATP hidrolisadas, é necessário que o ciclo se repita para que a proteína FeMo acumule elétrons suficientes para reduzir o nitrogênio atmosférico (BURRIS, 1991).

A estequiometria da reação catalisada pelo complexo da nitrogenase é representada pela reação (BURRIS, 1991):



Organismos endofíticos diazotróficos tem um enorme potencial para o uso como biofertilizantes em função de sua capacidade para colonizar o interior das plantas e estabelecer-se em nichos protegidos do oxigênio permitindo assim condições adequadas para a fixação biológica de nitrogênio. Essas propriedades podem ser a razão para a alta fixação de nitrogênio observada em cana-de-açúcar que é colonizada por diversos endófitos diazotróficos incluindo os do gênero *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* (URQUIAGA *et al.*, 1992).

2.3 Cana-de-açúcar

Introduzida no período colonial do Brasil, a cana-de-açúcar transformou-se em uma das principais culturas da economia brasileira. O Brasil não é apenas o maior produtor de

cana, é também o maior produtor mundial de açúcar e o segundo maior de etanol, conquistando cada vez mais o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (Ministério da Agricultura, 2013).

A cana-de-açúcar pertence à família *Poaceae*, subfamília *Panicoide*, gênero *Saccharum* L. (GAUT, 2002). Essa planta é cultivada no cinturão 35°N a 35°S e do nível do mar até 1000 metros de altitude numa ampla variedade de tipos de solo (MALAVOLTA, 1994). Há pelo menos seis espécies do gênero, sendo a cana-de-açúcar cultivada um híbrido multi-específico, recebendo a designação *Saccharum* spp. Toda cana-de-açúcar comercialmente cultivada hoje são híbridos inter-específicos (WRIGLEY, 1982).

A cana-de-açúcar é uma cultura perene que usualmente produz em torno de 3 a 6 anos antes de ser replantada. A primeira colheita leva em torno de 9-24 meses para estar madura, dependendo da localização. O replantio é necessário pelo declínio de produção ao longo do tempo devido à colheita e danos do solo causados por compactação do solo pelo tráfego de veículos pesados na época de colheita. O decréscimo anual dos rendimentos da colheita pode alcançar níveis economicamente inviáveis, o que torna necessário o replantio (PURSEGLOVE, 1979; MATSUOKA *et al.*, 1999).

O crescimento da cana-de-açúcar no campo é também influenciado pelo suprimento de água, fertilidade do solo (nitrogênio, fósforo e potássio), e níveis de molibdênio no solo, que é conhecido por interferir na fixação biológica de nitrogênio (BALDANI *et al.* 2002).

A biomassa é conceituada como sendo material vegetal proveniente de plantas, tal como milho, soja, cana-de-açúcar e árvores diversas. Entre as gramíneas, a cana-de-açúcar se destaca pela alta produção de matéria seca por hectare e pela capacidade de manutenção do potencial energético durante o período seco, além disso, o seu replantio pode se dar

apenas a cada 3 ou 5 anos, sendo considerada uma alternativa de alimento para a seca (EMBRAPA, 2002).

A cana-de-açúcar pode ser utilizada na alimentação animal, produção de açúcar, produção de etanol por processo fermentativo, além de bebidas como cachaça ou rum e outras bebidas alcoólicas. Enquanto as fibras, principais componentes do bagaço, podem ser usadas como matéria prima para produção de energia elétrica através da queima e produção de vapor em caldeiras que movem turbinas. O etanol é obtido pela fermentação da sacarose obtida do extrato da cana-de-açúcar. O etanol hidratado resultante da destilação é uma mistura de etanol e água (96% etanol e 4% água). O bagaço é obtido depois do processamento da cana-de-açúcar e consiste numa biomassa de lignina, hemicelulose e celulose. O volume de bagaço que se obtém varia entre 240-280 kg por tonelada de cana-de-açúcar e pode ser queimado para gerar energia (COPERSUCAR, 2008). O bagaço também pode ser usado na produção de etanol através da hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose que são convertidas em pentoses e hexoses que depois de um processo de purificação a mistura resultante pode ser fermentada para produção de etanol (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011).

A cana-de-açúcar é mais eficiente para a produção de etanol do que o milho (PATZEK & PIMENTEL, 2005). Um litro de etanol é obtido a partir de cerca de 12 a 14 Kg de cana-de-açúcar fresca (FERGUSON, 2004; PATZEK & PIMENTEL, 2005). Além disso, são necessários 3177 kcal para produzir um litro de etanol de cana-de-açúcar no Brasil, comparado com 4578 kcal de etanol de milho nos Estados Unidos. Como um litro de etanol tem um valor energético de 5130 kcal, o rendimento energético da cana-de-açúcar é cerca de 4-5 vezes maior que o etanol de milho (PIMENTEL & PATZEK, 2007). O

Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo que a produção de 2011 foi de 734 milhões de toneladas (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

Estima-se que o suprimento de combustível “convencional” atinja seu pico em período relativamente curto e seu declínio posterior não possa ser totalmente compensado por outros combustíveis líquidos (YOUNGQUIST & DUNCAN, 2003). O etanol de cana-de-açúcar representa hoje a melhor alternativa ao uso dos combustíveis fósseis. Recentemente o interesse econômico na cana-de-açúcar tem aumentado significativamente devido ao aumento da demanda mundial pela produção de energia sustentável. A experiência brasileira na produção de álcool a partir de cana-de-açúcar influenciou o estabelecimento de uma oferta mundial que atenda a demanda de uma adição de 10 % de etanol na gasolina. Estima-se que a produção brasileira de cana deve dobrar na próxima década para atingir esse objetivo (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011).

A gasolina brasileira já contém em torno de 20-24% de álcool. A mistura contribui para uma melhora ambiental global, uma vez que há uma considerável diminuição de emissão de CO (57% menos), hidrocarbonetos (64% menos) e NO (13% menos) (BODDEY, 1995). No entanto, algumas das contribuições econômicas e energéticas da produção de etanol, tanto no Brasil como nos Estados Unidos, são minimizadas pelos problemas de poluição ambiental associados à produção de etanol usando cana-de-açúcar. Muitos dos impactos ambientais no Brasil relacionados com a produção de cana-de-açúcar também ocorrem nos Estados Unidos. A produção de cana-de-açúcar causa maior erosão de solo do que qualquer outro cultivo no Brasil porque a biomassa total de cana-de-açúcar é colhida e processada para produção de etanol. A remoção da maior parte da biomassa deixa o solo vulnerável, desprotegido e exposto à erosão da chuva e ventos (PIMENTEL & PATZEK, 2007). Adicionalmente, a produção de cana-de-açúcar usa quantidades maiores

de herbicidas, inseticidas e adubos nitrogenados do que a maioria das culturas produzidas no Brasil, e esses aditivos químicos espalham-se pelo solo e águas causando significativa poluição (NAS, 2003). No entanto, os impactos do cultivo de cana-de-açúcar no ambiente podem ser reduzidos por adotar práticas de agricultura menos danosas tais como a eliminação da queima antes da colheita e a redução do uso de fertilizantes (OMETTO *et al.*, 2005).

2.4 - Interação planta-bactéria

A população microbiana, dentro e fora das raízes, inclui bactérias, fungos, leveduras e protozoários. Alguns são de vida livre, outros formam associações simbióticas com várias plantas. A interação entre esses microrganismos e raízes da planta pode ser benéfica, nociva ou neutra para a planta, e algumas vezes o efeito dos microrganismos pode variar em virtude das condições do solo (GLICK *et al.* 1994).

A rizosfera é uma microzona na interface raiz-solo que está sob influência da raiz da planta, e pode variar de 2-80 mm, dependendo da espécie da planta. Muitos processos de interação física, química e biológica acontecem nesta região. A rizosfera distingue-se das regiões do solo pela atividade microbiana aumentada, característica essa de importância fundamental para a biodisponibilidade e mobilidade de íons nutrientes, metais inorgânicos e contaminantes orgânicos (AHMAD *et al.*, 2008).

Procariotos de vida livre com a capacidade de fixar dinitrogênio atmosférico são ubíquos no solo. A capacidade para a fixação de nitrogênio está amplamente representada nos domínios Bacteria e Archaea. A grande diversidade de diazotróficos também se estende às características fisiológicas, sendo que a fixação biológica de nitrogênio é executada por quimiotróficos e fototróficos, por autotróficos e heterotróficos (OREN, 1994).

Em ecossistemas naturais, a fixação biológica de nitrogênio (por bactérias livres, associadas ou simbióticas) é a fonte mais importante de nitrogênio. A contribuição estimada de procariotos de vida livre para o balanço de nitrogênio nos solos varia de 0 a 60 Kg ha⁻¹ ano⁻¹ (KAMEKURA, 1998).

Em geral, as populações de bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas são encontradas associadas às raízes, indicando que as raízes são os sítios preferenciais para a colonização e atividade para a bactéria. A inoculação de cana-de-açúcar micropropagada com *H. seropedicae* resultou em um significativo aumento do peso seco da planta (CANUTO *et al.*, 2003) assim como aumentos significativos da razão partes aéreas/raízes (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Neste trabalho de Oliveira *et al.*, (2002), foram constatados os maiores aumentos na produção de matéria seca de cana-de-açúcar micropropagada quando se inoculou essas plantas com uma mistura de *G. diazotrophicus* e *Herbaspirillum spp.* quando comparada com plantas não inoculadas.

É razoável supor que colheitas contínuas de cana-de-açúcar deveriam depletar as reservas de nitrogênio do solo de tal modo que a produção eventualmente declinasse. Contudo, tal declínio na produção ou na reserva de nitrogênio do solo não é normalmente observado mesmo depois de muitas décadas ou mesmo séculos de cultivo de cana-de-açúcar. Tais observações tem levado a comunidade científica a sugerir que o cultivo de cana-de-açúcar pode se beneficiar significativamente da fixação biológica de nitrogênio (DOBEREINER *et al.*, 1994). De fato, experimentos usando nitrogênio marcado (¹⁵N) mostraram que plantas de cana-de-açúcar com 90 dias obtiveram consideráveis quantidades de nitrogênio advindas da fixação biológica de nitrogênio (RUSCHEL *et al.*, 1975). Urquiaga e colaboradores (1992) realizaram um estudo de três anos do balanço de nitrogênio com diluição do isótopo ¹⁵N usando dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas

em um tanque de concreto (20 x 6 x 0,8m) preenchido com solo suprido com matéria orgânica com o isótopo ^{15}N , e usando como controle a planta não nodulante e, portanto não fixadora de nitrogênio, *Brachiaria arrecta*. O solo continha um baixo teor de nitrogênio (0,108 % de N) e foi fertilizado com fosforo, potássio e micronutrientes e bem irrigado, mas sem suplementação com nitrogênio. No primeiro ano a produção das variedades comerciais foi alta, variando de 175 a 230 toneladas por hectare, e nas variedades CB 45-3 e SP 70-1143, essas altas produções foram mantidas nas duas colheitas subsequentes. Ao longo dos três anos, a média ponderada de todos os valores de enriquecimento de ^{15}N das variedades de cana-de-açúcar foi menor do que as de *B. arrecta* controle, indicando grandes contribuições da fixação biológica de nitrogênio para a cana-de-açúcar.

Esses resultados foram confirmados com um experimento de longo prazo de balanço de nitrogênio conduzido numa plantação de cana-de-açúcar em Pernambuco. Neste experimento, ao final de nove anos de estudo o total de nitrogênio acumulado no sistema foi entre 300 e 620 Kg ha⁻¹ maior que a quantidade de nitrogênio inicial. Esse nitrogênio extra foi atribuído à adição pela fixação biológica de nitrogênio numa média anual entre 38 e 77 kg de N por hectare, sendo essa uma estimativa mínima onde perdas na forma de gás nitrogenado ou por lixiviação não foram quantificadas (OLIVEIRA *et al.*, 1994).

Reis Jr *et al.* (2000) avaliaram a quantidade de *H. seropedicae* em raízes e caules em duas espécies de cana-de-açúcar suplementadas com fertilizantes nitrogenados (Tabela 1), onde constatou-se uma maior quantidade de tais bactérias nos controles, ou seja, a presença do fertilizante, de algum modo, diminuiu a quantidade de *H. seropedicae* nas raízes e caules da cana-de-açúcar, os mesmos resultados foram obtidos para outra espécie fixadora de nitrogênio *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Tate (1995) relatou que a população de bactérias diazotróficas é numericamente significativa no solo quando neste

não houver N disponível suficiente para a população bacteriana total. A capacidade de competição das bactérias diazotróficas é geralmente menor em relação às demais bactérias do solo, destacando-se esta população em solos que apresentam baixa disponibilidade de N. No trabalho realizado por Baldani *et al.*, (1987), a maior eficiência para o sistema planta-bactéria foi obtido quando houve aplicação de doses menores de N.

TABELA 1: LOG DO NÚMERO DE *Herbaspirillum spp.* POR GRAMA DE PESO SECO COLONIZANDO RAÍZES E CAULES DE DUAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (SP 79-2312 E SP 70-1143), CULTIVADAS COM E SEM FERTILIZANTES NITROGENADOS.

<i>Herbaspirillum spp.</i>	SP 79-2312		SP 70-1143	
	(+N)	(-N)	(+N)	(-N)
Raízes	3,52	3,71	3,62	4,05
Caule	1,94	1,73	2,09	2,19

Os tratamentos (+N) receberam 300 kg N ha⁻¹. Os valores reportados correspondem à média de quatro experimentos. Adaptado de Reis Jr *et al.*, (2000).

Um estudo conduzido na Índia com quatro variedades de cana-de-açúcar verificou que a inoculação com uma mistura de diferentes bactérias diazotróficas mais fungos micorrízicos, em que a hifa fúngica interage simbioticamente com as raízes das plantas, produziu uma resposta equivalente à meia dose (uma dose varia entre 80 – 100 Kg ha⁻¹ ano⁻¹) recomendada de fertilizantes nitrogenados (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 1999).

Além da fixação biológica de nitrogênio, as rizobactérias promotoras de crescimento da planta (PGPR) podem ajudar a planta superar ou evitar parcialmente uma variedade de estresses ambientais, bem como estimular seu desenvolvimento. O modo de ação de estirpes promotoras do crescimento da planta pode ser indireto e direto. O modo direto consiste na síntese de fitormônios e vitaminas essenciais, modulação das vias de sinalização das plantas, tais como a síntese de etileno e o aumento da resistência ao stress

da planta (BASHAN & De-BASHAN, 2005; SPAEPEN *et al.*, 2007). O modo direto envolve também a provisão de fósforo biodisponível para a captação pela planta, fixação biológica de nitrogênio, sequestro de ferro para a captação da planta por sideróforos, e a diminuição da produção de etileno da planta (GLICK, 1995). O modo indireto inclui a produção de antibióticos, redução da disponibilidade de ferro para fitopatógenos e síntese de enzimas que hidrolisam componentes da parede celular. Indiretamente, os organismos endofíticos podem também proteger as plantas de fitopatógenos por produzir agentes antifúngicos ou anti-bacterianos e sideróforos, que reduzem a disponibilidade de ferro para fitopatógenos (DOBBELAERE *et al.*, 2003; RYAN *et al.*, 2008;). *Herbaspirillum spp.* estimula o crescimento das plantas por vários desses mecanismos (BASTIÁN *et al.*, 1998; GYANESHWAR *et al.*, 2002; ROTHBALLER *et al.*, 2008).

O Brasil tornou-se o líder mundial na substituição de fertilizantes nitrogenados pela fixação biológica de nitrogênio. Embora a agricultura brasileira seja uma das principais atividades de exportação, o país consome somente 6% do total mundial de fertilizantes e é um dos que menos usa fertilizante nitrogenado, participando do uso de 3% do que se produz mundialmente de fertilizante nitrogenado (DOBEREINER, 1997; ANDA, 2011).

2.5 Colonização endofítica por *Herbaspirillum*

Em muitas das interações benéficas entre plantas e bactérias, as bactérias fixadoras de nitrogênio são capazes de viver dentro dos tecidos das plantas. Döbereiner *et al.* (1990), introduziram o termo “diazotrofo endofítico” para definir bactérias fixadoras de nitrogênio com a capacidade de colonizar o interior de gramíneas (*Poaceae*). Embora essa definição originalmente implicava em um modo de vida endofítico obrigatório ou exclusivo (HALLMANN *et al.*, 1997), agora é claro que muitas dessas bactérias também colonizam a superfície de raízes bem como tecidos internos da planta.

A colonização endofítica de cana por *Herbaspirillum* começa com a adesão da bactéria à superfície das raízes, seguidas pela colonização nos pontos de emergência de raízes laterais e a posterior penetração através de descontinuidades epidérmicas; isso parece envolver estruturas de envelope bacteriano, tais como lipopolissacarídeos (LPS), exopolissacarídeos (EPS), adesinas e o sistema de secreção do tipo III (T3SS). Todo esse processo parece dispensar a atuação de enzimas de degradação da parede celular. Os espaços intercelulares são então rapidamente ocupados, ocorrendo a colonização do xilema e partes aéreas das plantas hospedeiras. Cascatas de sinalização de fitormônios são também ativadas, regulando o desenvolvimento da planta. Essa complexa comunicação molecular entre algumas espécies de *Herbaspirillum* e plantas hospedeiras pode resultar em promoção do crescimento da planta (JAMES & OLIVARES 1998; revisado por MONTEIRO *et al.*, 2012)(Figura 1).

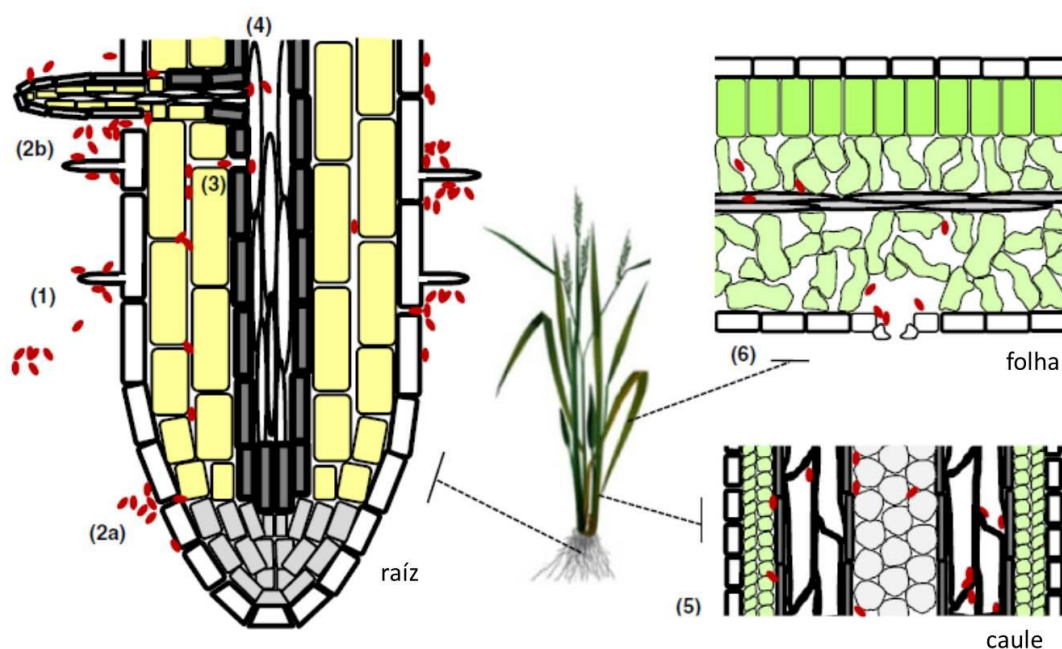


FIGURA 1: VIA DE COLONIZAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR POR *Herbaspirillum seropedicae* (pequenas elipses vermelhas). Sob condições laboratoriais, essa associação tem início com a adesão da bactéria à superfície da raiz da planta preferencialmente nos pêlos

radiculares (1). A minoria das bactérias adentram através de descontinuidades epidérmicas (2a) e sítios de emergência de raízes secundárias (2b), levando a uma rápida ocupação dos espaços intercelulares e xilema (3). Algumas bactérias movem-se da raiz às partes aéreas através do xilema (4), colonizando eventualmente o caule (5) e folhas (6). (Figura de MONTEIRO et.al., 2012)

James e Olivares (1998) mostraram na sua revisão que *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* podiam entrar no xilema de raízes de cana-de-açúcar, axenicamente cultivadas, pelas suas junções laterais. Silva *et al.*, (2003) observou uma semana depois da inoculação que *H. seropedicae* em íntimo contato com a parede celular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar RB 72454. Nos sítios de adesão foi possível visualizar protrusões a partir do envelope bacteriano na direção das células da planta, sugerindo que alterações no envelope bacteriano são necessárias para a interação.

Apesar do extenso conhecimento relativo aos aspectos histológicos que acompanham a colonização de plantas por *Herbaspirillum spp.*, os mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-*H. seropedicae* (tanto epifítica quanto endofítica) não são ainda entendidos de modo satisfatório. Exsudatos de raízes com os flavonóides naringenina e dadzeína promovem colonização por *H. seropedicae* em raízes laterais de *Arabidopsis thaliana*, sugerindo que esses compostos são importantes durante o processo de colonização (GOUGH *et al.*, 1997). A naringenina pode também regular a expressão gênica de uma variedade de genes em *H. seropedicae*, tais como genes envolvidos na biossíntese de parede celular (TADRA-SFEIR *et al.*, 2011). A inoculação de cana-de-açúcar com *Herbaspirillum sp.* leva à indução de quinases e dois genes R de cana-de-açúcar (ROCHA *et al.*, 2007). Este resultado somado ao que se sabe da interação entre *H. seropedicae* e cana-de-açúcar (CORDEIRO *et al.*, 2013), mostram que o perfil de expressão gênica pode ser alterado tanto na bactéria quanto na planta hospedeira.

2.6 Promoção de crescimento vegetal por *Herbaspirillum*

Para evidenciar o efeito da fixação de N_2 no crescimento da planta, Roncato-Maccari *et al.*, (2003) inocularam plantas de arroz com duas estirpes de *H. seropedicae*, uma Nif^+ (LR15), estirpe mutante construída pela inserção de um cassete *gusA*-canamicina dentro do gene *nifH* de *H. seropedicae* selvagem e a outra Nif^- (IM40) que é um mutante que carrega uma fusão cromossômica *nifH::lacZ* e não é capaz de fixar nitrogênio. *H. seropedicae* Nif^+ e Nif^- foram capazes de colonizar milho, sorgo e trigo como evidenciado pelo número de bactérias recuperadas de plantas inoculadas dez dias depois da inoculação. Ambas as estirpes aumentaram o peso seco da raiz de arroz de maneira similar. Estes resultados sugerem que a promoção do crescimento por *H. seropedicae* não é somente devido à fixação biológica de nitrogênio, sugerindo o envolvimento de outros fatores. Foi também mostrado que a promoção de crescimento de cana-de-açúcar colonizada por *G. diazotrophicus* Nif^- e selvagem se deve a outros fatores além da fixação biológica de nitrogênio (SEVILLA *et al.*, 2001), fato já bem conhecido para *Azospirillum* spp. colonizando várias plantas (BASHAN *et al.*, 2005).

Estudos que avaliaram a inoculação em *H. seropedicae* demonstrou que há um significativo aumento na biomassa total de arroz e cana-de-açúcar (BODDEY *et al.*, 1995; BALDANI *et al.*, 2000; JAMES *et al.*, 2002; GYANESHWAR *et al.*, 2002), e algumas características bacterianas como fixação biológica de nitrogênio, fitormônios, ACC deaminase e produção de sideróforos são tidos como os responsáveis pelo aumento no crescimento da planta.

O etileno é o único hormônio gasoso produzido pelas plantas. É conhecido como um hormônio do ferimento, porque sua produção pode ser induzida por perturbações físicas ou químicas no tecido da planta. Entre os muitos efeitos no crescimento da planta em

desenvolvimento, a produção de etileno pode inibir o crescimento da raiz. Em alguns casos, os efeitos da promoção de crescimento e a enzima ACC deaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase) pela bactéria estão ligados ao decréscimo nos níveis de etileno da planta, especialmente na presença de uma variedade de estresses ambientais (GLICK *et al.*, 2007). A enzima ACC deaminase desempenha um papel chave na degradação de ACC. Os produtos dessa hidrólise são amônia e α -cetoglutarato, que podem ser usados pela bactéria como fonte de nitrogênio e carbono, respectivamente, para crescimento (KLEE *et al.*, 1991). Dessa forma, a bactéria consome ACC e diminui o nível de etileno nas plantas, prevenindo algumas consequências deletérias que as altas concentrações de etileno podem trazer. Na natureza, a ACC deaminase é comumente encontrada em bactérias do solo que colonizam raízes (GLICK *et al.*, 1999). Muitos desses microrganismos foram identificados pela sua capacidade de crescer em meio mínimo contendo ACC como única fonte de nitrogênio. Dessa forma, *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Azoarcus spp.*, *Azorhizobium caulinodans*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Azotobacter spp.*, *Azorhizophilus* e *Pseudomonas spp.* foram todos capazes de usar ACC como única fonte de nitrogênio para crescimento (AHMAD *et al.*, 2008). Plantas inoculadas com bactérias que possuem ACC deaminase ou plantas transgênicas que expressam genes bacterianos de ACC deaminase podem regular seus níveis de etileno e consequentemente contribuir para um sistema radicular mais extenso (ARSHAD *et al.*, 2007).

A produção de sideróforo potencialmente provê um duplo mecanismo da promoção do crescimento da planta: aumentando a captação de ferro pela planta e suprimindo a utilização de ferro por patógenos da rizosfera (AHMAD *et al.*, 2008).

Outras características que podem estar envolvidas na colonização das plantas por endófitos, tais como bactérias do gênero *Herbaspirillum*, podem ser a presença de sistema de secreção do tipo III, *pili* tipo IV, adesina/hemaglutininas e síntese de lipopolissacarídeos e exopolissacarídeos. Genes necessários para estas características foram identificados no genoma de *H. seropedicae* SmR1 (PEDROSA *et al.*, 2011).

O potencial de *Herbaspirillum spp.* como inoculante (aplicação de colônias da bactéria com veículos inoculantes como bagaços de cana, serragem, casca de arroz, farelo de trigo, entre outros) de plantas foi demonstrado por vários estudos uma vez que a interação existente entre cana-de-açúcar e *H. seropedicae* é bem documentada (BALDANI *et al.*, 2002). Trabalhos utilizando a técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) com anticorpos policlonais purificados contra estirpes PRJ2 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), HRC54 (*H. seropedicae*) e HCC103 (*H. rubrisubalbicans*), mostraram muitas populações dessas bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio colonizando diferentes partes da cana-de-açúcar cultivada no campo (LI & MACRAE 1992; BODDEY *et al.*, 2000).

Recentemente o proteoma de bactérias endofíticas tais como *G. diazotrophicus* foi analisado para identificar proteínas envolvidas na interação. Dos Santos *et al.*, (2010) inocularam *G. diazotrophicus* em cana-de-açúcar micropropagada e recuperaram a bactéria 7 dias depois para a análise proteômica e encontraram 42 proteínas diferencialmente expressas relacionadas com reações redox, associadas com membrana, regulação transcricional e traducional, e metabolismo energético.

2.7 Análise Proteômica

Muitos avanços foram alcançados ultimamente na biologia molecular com o sequenciamento em larga escala de diversos genomas graças aos sequenciadores de última geração. O advento dessas técnicas de sequenciamento de genomas gerou uma quantidade imensa de dados que, por si só, não trazem informações sobre eventuais modificações pós traducionais e nem do controle da atividade gênica em resposta a condições ambientais específicas. Evidentemente, apenas o entendimento genômico não possibilita uma compreensão completa acerca dos diversos mecanismos fisiológicos ou patológicos que operam nos organismos. Isto se deve ao fato da sequência gênica corresponder a um repositório estático da informação genética, enquanto que estudos funcionais como a análise proteômica abarcam as respostas celulares às mais diversas situações que são extremamente dinâmicas (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

O grande avanço da análise proteômica não se deve tão somente a capacidade de identificar sequências polipeptídicas, mas também por detectar seus níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios. O proteoma reflete o conjunto de proteínas produzidas por uma célula sendo, portanto, a expressão funcional do genoma condicionada ao estágio de desenvolvimento e diferenciação, assim como de condições específicas e temporais do ambiente. Tais características fazem com que o estudo proteômico seja bastante desafiador, pois a expressão gênica de uma célula é bastante dinâmica, dificultando, em princípio, o uso de métodos automatizados e outras estratégias de larga escala utilizadas no sequenciamento genômico. Apesar disso, a análise proteômica é a ferramenta mais apropriada para se entender o funcionamento dos genes, porque analisa o produto final do genoma que é a proteína (MANN *et al.*, 2001).

As análises da expressão gênica através dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) ou dos níveis protéicos, são ferramentas importantíssimas para se compreender o funcionamento dos sistemas biológicos. Entretanto, os níveis de mRNA não correspondem necessariamente com a abundância das proteínas devido à meia vida do mRNA, modificações pós-transcricionais que ocorrem no transcrito primário, a ativação ou não da tradução do mRNA para proteína. Estas modificações não são detectadas no nível de mRNA, mas desempenham funções significantivas na estabilidade protéica, localização, interações e mecanismos de ação (BERTUCCI *et al.*, 2006).

A análise proteômica representa uma ferramenta importante para integrar a informação no nível protéico ao processo de anotação genômica e aumentar sua qualidade, pois enquanto a identificação de todas *open reading frames* (ORFs) presentes em uma sequência de DNA é um exercício relativamente simples, a informação de quais ORFs representam genes que realmente codificam para uma proteína podem ser obtidas através do proteoma (ANSONG *et al.* 2008). Há agora vários estudos na literatura onde os genes preditos foram validados no nível protéico. Por exemplo, Jaffe e colaboradores (2004) usaram LC-MS/MS para validar a maioria dos genes preditos no genoma da bactéria *Mycoplasma pneumoniae*. Neste trabalho os peptídeos detectados em um lisado de células de *M. pneumoniae* foram mapeados no genoma e os peptídeos recorrentes foram relacionados com as ORFs encontradas durante a anotação do genoma gerando o que foi chamado de “mapa proteogenômico”.

2.7.1 Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional com gel de poliacrilamida (2D-PAGE) tem sido um método bastante utilizado para a obtenção de uma visão global da expressão protéica sob diferentes condições. Esta técnica foi, pioneira e independentemente, descrita por O'Farrel (1975) e Klose (1975), e requer duas corridas eletroforéticas sequenciais em duas dimensões: a primeira dimensão é a focalização isoeletrica (IEF) e a segunda dimensão é a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Na focalização isoeletrica as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico em tiras de pH imobilizado (GÖRG *et al.*, 2007). Após esta etapa, é realizada a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, na qual as proteínas distribuídas de acordo com seu pI são separadas de acordo com suas massas moleculares.

Embora popular, a análise proteômica baseada em gel 2D-PAGE acoplada com espectrometria de massas tem muitas limitações. Trata-se de uma técnica laboriosa onde proteínas de baixa abundância são particularmente difíceis de detectar em misturas complexas de proteínas e contaminantes. Há a necessidade de se fazer escolha da faixa do gradiente de pH a ser usado na primeira dimensão, bem como o percentual de acrilamida usado no gel da segunda dimensão que definirá quais proteínas serão bem separadas. Assim, a abordagem proteômica baseada em géis bidimensionais sempre falhará na detecção de certas proteínas (QUIRINO *et al.*, 2010).

A eletroforese bidimensional permite também separar as várias formas protéicas que tenham sofrido modificações pós-traducionais. A separação destas formas é possível visto

que essas modificações conferem propriedades diferentes à proteína, em particular, um diferente pI ou massa molecular (YAMAGATA *et al.*, 2002).

Embora a eletrofose bidimensional não seja facilmente automatizada, a possibilidade de realizar corridas paralelas de replicatas biológicas lhe dá uma alta confiabilidade estatística em análises complexas. Por isso esta técnica tem se tornado rotina em análises proteômicas. Além disso, a possibilidade de fazer múltiplas comparações, e não somente comparações binárias, é de muito valor quando situações biológicas complexas como a interação simbiótica entre plantas e bactérias devem ser avaliadas (RABILLOUD *et al.*, 2010).

A análise proteômica baseada em géis 2D funciona muito bem para bactérias. No entanto, alguns problemas surgem quando as proteínas que se deseja avaliar a expressão não são abundantes ou são pouco solúveis, gerando restrições na análise. Isso não significa, contudo, que a análise proteômica baseada em géis bidimensionais não deva ser aplicada a esse tipo de problema, pois quando a questão biológica de interesse pode ser respondida, ao menos parcialmente, utilizando o conjunto de proteínas passíveis de serem analisadas por géis 2D, as vantagens operacionais dos géis (robustez e reprodutibilidade) permitem a obtenção de resultados relevantes (RABILLOUD *et al.*, 2010).

2.7.2 – Espectrometria de massa

Alta sensibilidade e velocidade são duas vantagens da espectrometria de massa (MS). A inovação que fez da MS uma ferramenta robusta na análise proteômica foi a introdução de técnicas de dessorção (liberação de moléculas de uma superfície) tal como MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionization*), que pode transformar

macromoléculas em íons na fase gasosa para análise de MS sem perder sua estrutura (KARAS & HILLENKAMP, 1988; TANAKA *et al.*, 1988).

O espectrômetro MALDI-ToF utiliza o método de MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) para ionização e está acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo, ToF (*Time of Flight*). Este espectrômetro de massa foi o utilizado para a realização deste trabalho.

A espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF é relativamente simples e robusta para operar, possui boa acurácia de massa, alta resolução e sensibilidade. É amplamente usada em proteômica para a identificação de proteínas provenientes de misturas simples.

Quando o MALDI é usado, as amostras de interesse são co-cristalizadas com a matriz em uma superfície de metal. A matriz é, tipicamente, uma molécula de ácido orgânico fraco que absorve radiação eletromagnética no comprimento de onda do laser utilizado. O sólido resultante da mistura entre matriz e amostra é então irradiado por pulsos de laser de nano-segundos. Em geral um laser de nitrogênio com um comprimento de onda de 337 nm é utilizado. A energia do laser é rapidamente transferida, gerando uma pluma vaporizada de matriz e contendo os analitos na fase gasosa onde adquirem carga. Um forte campo elétrico força os analitos carregados em um tubo de voo até a alcançar rapidamente o detector a diferentes velocidades determinadas pelas diferentes razões massa/carga (m/z) dos peptídeos (ZHU *et al.*, 2003). Os íons pequenos tem uma velocidade maior e são detectados antes dos íons maiores, produzindo um espectro de tempo de voo. Uma significativa vantagem da espectrometria de massa baseada em MALDI-ToF é que se trata de um método relativamente fácil de executar, rápido e pode ser automatizado (ZHU *et al.*, 2003; MANN *et al.*, 2001).

Para a identificação protéica, os picos obtidos da razão m/z da mistura de peptídeos resultante da digestão proteolítica gera uma impressão digital de peptídeos (PMF) e/ou uma sequência de massa espectrométrica (MS/MS – *tandem mass spectrometric*) que podem ser buscados em banco de dados de proteínas, como por exemplo Swiss-Prot, NCBIInr e MSDB (BAIROCH & APWEILER, 1997; BOECKMANN *et al.*, 2003; WHEELER *et al.*, 2007) por algoritmos como o Mascot (PERKINS *et al.*, 1999).

No método PMF, uma lista de massas de peptídeos mensurados experimentalmente, que é referida como a impressão digital de peptídeos de uma proteína e é única para cada proteína, é produzida e comparada com PMF teoricamente derivada do banco de dados. A identificação é alcançada quando há uma correspondência entre as razões massa/carga experimentais da proteína alvo e as massas teóricas de PMF de uma proteína candidata específica no banco de dados (PERKINS *et al.*, 1999).

Na abordagem por MS/MS, adicionalmente à PMF, a análise dos espectros por MS/MS revela informações estruturais que são relacionadas à sequência do peptídeo, contribuindo para a especificidade da identificação da proteína alvo (GYGI & AEBERSOLD, 2000). A mistura de peptídeos é primeiro analisada pela operação no modo normal MS, assim dados típicos de PMF são adquiridos. Então, no modo MS/MS, um íon do peptídeo é selecionado (pico parental) e então fragmentado via bombardeamento com um gás inerte numa célula de colisão ou mesmo com o laser de nitrogênio, resultando em fragmentos (íons filhos) sendo separados pela razão massa carga (m/z) pelo analisador gerando um espectro de MS/MS. O espectro de MS/MS obtido para os peptídeos de diferentes partes da proteína alvo são confrontados com o espectro de fragmentos teóricos de todos os peptídeos do banco de dados para alcançar a identificação (ENG *et al.*, 1994).

2.8 Análise proteômica no estudo da interação planta-bactéria

A análise proteômica tem se mostrado valiosa na avaliação dos impactos causados pelas plantas no proteoma de bactérias e vice versa. Embora tenha havido avanços significativos na elucidação dos detalhes das interações entre plantas e bactérias nos anos recentes, muitas questões fundamentais acerca destes processos permanecem ainda insolúveis. As caracterizações proteômicas permitem aos pesquisadores a investigação de respostas detalhadas de plantas e bactérias a vários tratamentos, e de um em relação ao outro. Dado o desenvolvimento de várias tecnologias proteômicas como géis bidimensionais (2-DE) e espectrometria de massa (MS), tem havido um aumento na literatura de trabalhos lidando com proteomas de plantas e bactérias (JORRÍN-NOVOA *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos reportados tem focado na detecção de mudanças da expressão protéica em resposta à toxicidade, mudanças nutricionais, mutações, ou super-expressão de genes particulares, com um número menor de estudos direcionados à interação planta-bactéria (CHENG *et al.*, 2010).

Alguns estudos proteômicos foram realizados para averiguar a relação entre planta e patógenos. Por exemplo, Jones *et al.*, (2004) inocularam *Arabidopsis thaliana* com *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 e constataram a indução de peroxiredoxinas e da proteína antioxidante glutathione S-transferase, indicando o estabelecimento de uma resistência basal e mudanças significativas nos níveis de enzimas do metabolismo, antioxidantes, e permeabilidade mitocondrial. Outro estudo proteômico envolvendo a infecção de tomate (*Lycopersicon hirsutum*) pela bactéria *Clavibacter michiganensis* subesp. *michiganensis* evidenciou a expressão diferencial de proteínas envolvidas na defesa

da planta, resposta ao stress, regulação de proteínas, síntese e processamento, produção de energia, e metabolismo (COAKER *et al.*, 2004).

A relação simbiótica entre leguminosas e rizóbios fixadores de nitrogênio é uma interação benéfica bem caracterizada entre plantas e bactérias. Muitas investigações proteômicas foram conduzidas para acessar os impactos das bactérias simbióticas no proteoma das plantas. Natera *et. al.*, (2000) conduziram um estudo de comparação entre mapas proteômicos de géis bidimensionais das raízes de *Melilotus alba* com e sem nódulos e detectaram proteínas da planta envolvidas na formação de nódulos tais como a nodulina e leghemoglobina (carreadora de oxigênio ou nitrogênio encontrada em nódulos de raízes leguminosas).

Em uma análise proteômica das raízes de soja (*Glycine max*) mostrou que a expressão de quitinase classe I e um gene induzido por stress H4, eram expressos somente nas raízes. Adicionalmente, a proteína quinase com domínio tipo calmodulina, fosfoenolpiruvato carboxilase, e ascorbato peroxidase foram mais abundantes na zona pelífera da raiz comparado ao resto da raiz. Supõe-se que essas proteínas sejam envolvidas no desenvolvimento da raiz ou no metabolismo. Além disso, um número de mudanças na expressão de proteínas da raiz em resposta à inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* também foi identificado (WAN *et al.*, 2005).

Outra categoria de estudos que também utilizam a abordagem proteômica é a avaliação dos impactos da planta na bactéria. Um estudo proteômico baseado em géis bidimensionais examinou os efeitos do exudato de raiz de *Brassica napus* (canola) na bactéria promotora do crescimento da planta, *Pseudomonas putida* UW4. Foi mostrado que proteínas de *P. putida* UW4 que facilitam o estabelecimento de interação planta-bactéria tiveram sua expressão aumentada em resposta ao exudato da raiz de canola. Ao mesmo

tempo que proteínas essenciais bacterianas envolvidas na síntese de proteínas e comunicação bacteriana (quimiotaxia e *quorum sensing*) tiveram sua expressão diminuída (CHENG *et al.*, 2009).

A rizosfera é um ambiente complexo e dinâmico onde múltiplos fatores bióticos e abióticos interagem uns com os outros e com as raízes das plantas, assim impactando profundamente a interação planta-bactéria. Para melhor entender os efeitos que plantas e bactérias tem um sobre o outro, vários pesquisadores usam a abordagem proteômica para deslindar as vias nas quais plantas e bactérias influenciam a expressão protéica em seus parceiros. Para tanto, o uso da tecnologia baseada em géis bidimensionais acoplada com a identificação de proteínas baseada em MS são técnicas frequentemente usadas para a análise da expressão diferencial de proteínas.

3-JUSTIFICATIVAS

Uma vez que o nitrogênio é o principal fator limitante da alta produtividade e do crescimento da planta, o uso de largas quantidades de adubos nitrogenados em fertilizantes levou a um aumento de ganhos na produtividade da colheita. Contudo, os fertilizantes causam impactos negativos no ambiente, tais como acidificação do solo e poluição da água por lixiviação, o que é amplificado pela baixa captação pelas culturas às quais são aplicados os fertilizantes (REDDY *et al.*, 2003). Nesse contexto, a fixação biológica de nitrogênio é vista como uma alternativa viável para suprir nitrogênio para as plantas. A substituição de 15% do suprimento de ureia com bactérias fixadoras de nitrogênio pode representar uma economia de 3,4 bilhões de dólares por colheita, e, além disso, o uso dessas bactérias pode significar enormes avanços em termos econômicos e ambientais (MONTEIRO *et al.*, 2012).

A cana-de-açúcar é um dos principais produtos da Agricultura Brasileira e tem sido cultivada no Brasil por muitas décadas com baixa ou nenhuma aplicação de fertilizantes nitrogenados. Há muitas áreas no país onde a cana-de-açúcar cresceu por décadas, ou mesmo séculos, mas nem a produção nem as reservas de nitrogênio do solo parecem ter diminuído com o tempo. Estes dados sugerem que a fixação biológica de nitrogênio é responsável pela manutenção da produtividade da cana-de-açúcar (URQUIAGA *et al.*, 1992; BODDEY, 1995). Assim, como a interação entre *Herbaspirillum seropedicae* e a cana-de-açúcar traz benefícios para essa cultura, é importante entender os mecanismos moleculares desta interação.

Lery *et al.*, (2008) usaram marcação isotópica para a análise diferencial do proteoma de *G. diazotrophicus* em interação com genótipos de cana-de-açúcar SP70-1143 e Chune e inoculadas 24 horas. Foram observadas respostas moleculares genótipo-específicas. Contudo, nesses estudos a população bacteriana não estava crescendo e estava

provavelmente em equilíbrio com as raízes das plantas. Para entender o estágio inicial da interação é necessário determinar o proteoma bacteriano logo após a exposição aos compostos derivados da planta.

O genoma de *H. seropedicae* foi sequenciado (PEDROSA *et al.* 2011) facilitando o uso da abordagem proteômica para estudar os efeitos dos compostos derivados da planta no perfil proteico bacteriano. Para melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos na interação cana-de-açúcar- *H. seropedicae*, foi utilizado a abordagem proteômica baseada em géis bidimensionais (2D-PAGE) para fracionar as proteínas e a espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF para identificar proteínas de *H. seropedicae* diferencialmente expressas na fase de crescimento logarítmica na presença e ausência de extrato de cana-de-açúcar.

4-OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a expressão diferencial de proteínas de *H. seropedicae* submetido ao cultivo com 5% de extrato de cana-de-açúcar B-4362 e, assim, ter indicações das rotas bioquímicas utilizadas na interação e, deste modo, contribuir para o avanço do conhecimento da interação entre plantas e bactérias endofíticas diazotróficas, sobretudo da interação benéfica entre a gramíneas e organismos diazotróficos como a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, por meio de análise proteômica.

Para isso as seguintes metas foram conduzidas:

- Obtenção de um protocolo de extração de proteínas otimizado para *H. seropedicae*.
- Determinação de um protocolo reprodutivo de géis bidimensionais das amostras protéicas de *H. seropedicae*.
- Obtenção da relação das bandas de proteínas diferencialmente expressas.
- Identificação por espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF das proteínas diferencialmente expressas.
- Análise relativa da transcrição de mRNA das proteínas diferencialmente expressas detectadas nos géis bidimensionais, pela técnica de qRT-PCR.
- Avaliação da resposta ao extrato de cana-de-açúcar de genes responsivos à naringenina.

5- MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - Estirpe utilizada

Foi utilizada a estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae* resistente à estreptomicina (SmR, Nif+ , SOUZA *et al.*, 1995).

5.2 - Meios de Cultivo

O meio de cultivo que foi utilizado para o crescimento da estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae* é o JNFb- malato (Tabela 2).

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO JNFb-MALATO

Ácido málico	0,5%
K ₂ HPO ₄	0,06%
KH ₂ PO ₄	0,18%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02%
NaCl	0,01%
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,002%
Azul de bromotimol ¹	0,001%
Solução de micronutrientes ²	2mL
FeEDTA ³	4mL
Biotina	0,1µg/mL

KOH	0,45%
Água destilada q.s.p	1000mL

1 – Solução em 0,2M de KOH

2 - 1g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,175g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,4g H_3BO_3 ; 0,04g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,12g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dH_2O q.s.p 1000mL.

3 - Solução 1,64%

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e a solução foi autoclavada durante 20 minutos a 1 atmosfera. O pH final do meio foi 6,9 na média das replicatas.

5.3 - Preparo do extrato de cana-de-açúcar

O extrato de cana-de-açúcar foi preparado por moagem da variedade de cana B-4362 que é uma variedade susceptível para a doença da estria mosqueada causada por microrganismos na qual manchas vermelhas aparecem nas folhas da cana-de-açúcar. Cerca de 800 mL do caldo foi centrifugado a 15°C a 18800 g por 30 minutos. Esta operação foi repetida três vezes para a retirada de toda a fibra remanescente. Em seguida o extrato centrifugado foi filtrado em membrana de 0,22 μm com o auxílio de uma bomba de vácuo e então armazenado em congelador -70°C. A esterilidade do extrato foi verificada adicionando ao meio JNFB-Malato, nas proporções usadas no experimento, sendo submetido à incubação a 30°C e 120 rpm durante dois dias sem nenhum inóculo. Não foi verificado nenhum crescimento bacteriano no meio.

5.4 - Condições de cultivo

Para o cultivo da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* foi utilizado o meio JNFb-malato suplementado com 20mmol/L de NH_4Cl e estreptomicina numa concentração final de 80 $\mu\text{g/mL}$. A bactéria foi cultivada a 30°C sob agitação de 120 rpm até atingir a DO_{600} de 0,6 (7-8 horas de incubação a 30°C, 120 rpm). A concentração final do extrato de cana no meio foi de 5%, e foi adicionado ao meio antes da inoculação de *H. seropedicae*. O tratamento controle consistiu no cultivo no meio JNFb-malato sem a suplementação com extrato de cana.

5.5 - Preparo das células para a eletroforese bidimensional

Um volume de 45 mL da cultura de *H. seropedicae* em fase exponencial de crescimento (DO_{600} de 0,6), foi transferida para um tubo de centrifuga e submetido a uma rotação de 12000g por 15 segundos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com 30 mL de PBS (3,0mmol/L KCl, 1,5mmol/L NaCl, 68mmol/L KH_2PO_4 e 9,0mmol/L NaH_2PO_4 , pH 7,4) e centrifugadas mais uma vez a 12000g por 15 segundos a 4°C. O sobrenadante resultante foi descartado e as células foram ressuspensas em 600 μL de solução de lise (7,0 mol/L uréia, 2 mol/L de tiouréia, 4% (p/v) CHAPS, 1% (p/v) IPGBuffer pH 4-7 e 20 mmol/L de DTT (GÖRG, 2007). As amostras foram aliquotadas (150 μL /tubo de 2mL) e armazenadas em congelador -70°C até o momento do uso.

As células (150 μL de suspensão congelada) foram lisadas com a adição de 450 μL da solução de lise, seguido de homogeneização e uma incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então sonicadas em banho de gelo (3 x 10 segundos com intervalos de 1 minuto, sonicador “*Ultrasonic Processor XL Heat Systems*”) e em seguida centrifugadas por 30 minutos a 20800g e 4°C. O sobrenadante foi transferido

para outro tubo e centrifugado novamente por 15 minutos nas mesmas condições. As proteínas foram dosadas segundo Bradford (1976) e as amostras armazenadas a -70°C até o momento do uso.

5.6 - Isoeletrofocalização

A isoeletrofocalização (IEF) das proteínas foi realizada em aparelho IPGphor (GE Healthcare). A IEF foi conduzida em tiras IPG com gradiente imobilizado de pH (GE Healthcare). A faixa de pH foi de 4 a 7 linear em tiras de 13 cm.

Previamente à IEF, 400 μg de proteína foram misturadas com o tampão de reidratação (8,5 mol/L de uréia, 2% de TWEEN 20, 2% CHAPS, 1% de IPG buffer pH 4-7, 20 mmol/L de DTT e 0,002% de azul de bromofenol) (SHUKLA, 2006), totalizando um volume final de 250 μL para a aplicação no suporte de isoeletrofocalização. Antes da aplicação a amostra foi homogeneizada em vortex e em seguida centrifugada a 10000 g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado no suporte sem formar bolhas e em seguida a tira com pH imobilizado foi posicionada com o gel voltado para a solução contendo a amostra e cobertas com 1 mL de óleo mineral (*“Dry Strip Cover Fluid”*). A reidratação foi de 16 horas a 50 V. Após a reidratação teve início a isoeletrofocalização que ocorreu em quatro etapas: *Step and hold* 500 Vhr, *Gradient* 800 Vhr, *Gradient* 11300 Vhr e *Step and hold* 16000 Vhr, totalizando 29400 Vhr. Após a IEF as tiras foram imediatamente equilibradas ou armazenadas em congelador -70°C para posterior utilização.

5.7 - Equilíbrio das tiras de gradiente de pH imobilizado

Após a isoeletrofocalização as tiras foram equilibradas por 30 minutos em 5mL de tampão de equilíbrio, contendo 50mmol/L Tris-HCl, 6mol/L uréia, 30% (p/v) glicerol e 2% (p/v) SDS em 50mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 8,8 e 0,002% (v/v) de solução de azul de bromofenol (GORG, 2007). Esta etapa foi repetida uma vez, sendo que na primeira etapa foram adicionados 50mg de DTT ao tampão de equilíbrio e ao segundo passo 200mg de iodoacetamida. Após os dois passos de equilíbrio as tiras foram lavadas com água destilada, submersas por alguns minutos em tampão de corrida (3g Tris-base, 14g de glicina, 1 g SDS por litro dH₂O) (LAEMMLI, 1970) e imediatamente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

5.8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese das proteínas contidas nas tiras IPG foi executada em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de separação foi usado na concentração de 10,5% de poliacrilamida (Proporção de Acrilamida e Bis-acrilamida: 29:1). A eletroforese foi realizada em géis de 18 cm x 16 cm em cuba “*Hoefer SE 600 Ruby*” (GE Healthcare). As tiras foram posicionadas horizontalmente no topo do gel de forma a manter pleno contato com este e em seguida cobertas com 2 mL de solução de agarose (1% de agarose, 1% de SDS e traços de azul de bromofenol). A corrida do gel foi feita limitando-se a corrente a 45mA por gel até o azul de bromofenol atingir o limite inferior do gel. Durante a corrida a temperatura foi mantida a 11°C por meio de refrigeração com circulador termostático. Todas as fases de preparo da amostra descritas até aqui estão representadas na Figura 2.

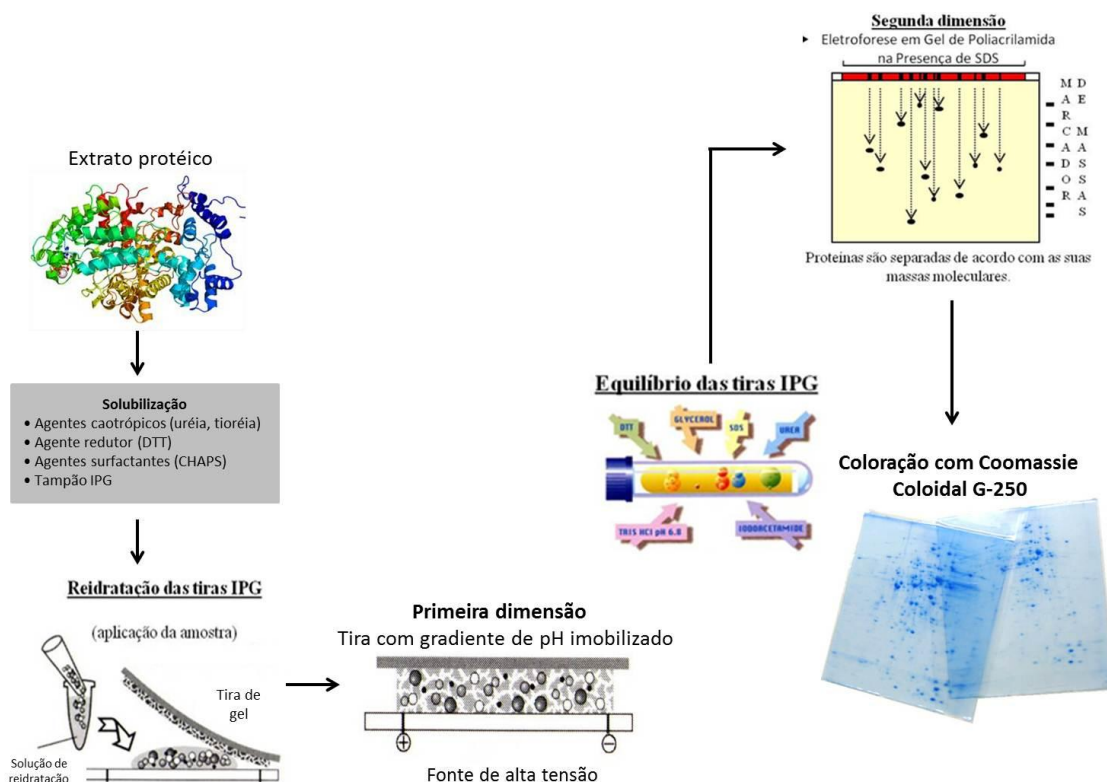


FIGURA 2: FASES DE PREPARO DA AMOSTRA E DE GÉIS BIDIMENSIONAIS (SDS-PAGE) (Adaptado de OLIVEIRA, 2011).

5.9 - Visualização dos géis

Os géis bidimensionais foram primeiramente fixados por no mínimo 60 minutos em uma solução de 5 mL de ácido *o*-fosfórico 85%, 100 mL de metanol e água q.s.p 500 mL. Em seguida, os géis com as proteínas fixadas foram visualizados através da coloração coloidal por *Coomassie Blue*. Os géis corados com *Coomassie* permaneceram pelo menos 12 horas em solução de *Coomassie Brilliant Blue G-250* (NEUHOFF *et al.* 1985) e foram descorados pela lavagem sucessiva com água.

5.10 - Captura das imagens

As imagens dos géis bidimensionais foram digitalizadas utilizando o scanner “*ImageScanner*” da GE Healthcare.

5.11 - Análise dos géis

A análise dos géis bidimensionais foi realizada utilizando o Programa Imagemaster 2D Platinum, versão 6.0 (GE Healthcare). Para cada condição nove géis de três replicatas biológicas e três replicatas técnicas foram analisados usando o ImageMaster™ 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare). A subtração do fundo foi feita utilizando o modo “*no spot*”. A detecção de bandas (spots) protéicas foi feita automaticamente seguida de correções manuais. O volume das bandas protéicas detectadas foi normalizado utilizando o modo de normalização de volume total dos spots, no qual o volume de cada spot é dividido pelo volume total dos spots detectados e multiplicado por 100. Os géis de cada condição foram comparados para verificar diferenças de expressão. Para identificar a expressão diferencial entre as duas condições de crescimento, análises estatísticas (Teste t de Student, 95% de intervalo de confiança) foram executadas e somente spots proteicos mostrando mudanças de expressão estatisticamente significativas com 1,5 vezes ou mais de alteração no volume da banda protéica foram analisados por espectrometria de massa. A mudança de expressão foi calculada usando a média dos volumes de spots dos nove géis 2D de cada condição.

5.12 - Retirada de proteínas dos géis bidimensionais

A retirada de proteínas para análise por espectrometria de massa foi feita com auxílio de uma ponteira de 1 mL com a ponta cortada. As proteínas foram retiradas e armazenadas em tubos tipo eppendorf ou placas de 96 poços em congelador -70°C .

5.13 - Preparo das amostras para análise espectrométrica

As bandas de proteína foram digeridas no gel com tripsina como descrito (SHEVCHENKO *et al.* 1996). As bandas foram cortadas do gel e divididas em pedaços menores (1 mm^2). Os pedaços do gel foram descorados em solução de acetonitrila 50%, bicarbonato de amônio 25 mmol/L pH 8,0 com lavagens de 1 hora com volumes de 400 μL e trocas de solução até a completa transparência dos pedaços de gel e remoção total do corante. Em seguida, o descorante foi removido e os pedaços de gel desidratados com 200 μL de acetonitrila 100% por 5 minutos. Este procedimento foi repetido uma vez mais no caso dos pedaços de gel não ficarem opacos. A acetonitrila foi então removida e os géis foram secos em *Speed Vac* por 15 minutos. Na etapa de digestão enzimática, os géis foram reidratados com 15 μL de uma solução de tripsina (concentração final 20ng/ μL) diluída em 40mmol/L de bicarbonato de amônia mais 10% de acetonitrila. Os pedaços do gel foram mantidos no gelo durante 30 minutos para a penetração da tripsina no gel sem que se inicie a digestão. Após esse tempo, o gel foi incubado por 16-24 horas a 37°C . O sobrenadante resultante dessa incubação foi utilizado para análise de espectrometria de massa.

Quando não houve sucesso na identificação dos peptídeos usando somente o sobrenadante obtido como descrito acima, passou-se à extração dos peptídeos do pedaço do gel. Essa extração se inicia pela remoção do sobrenadante da digestão para um tubo novo

de 500 μ L. Ao pedaço de gel foi adicionado 20 μ L de uma solução com TFA numa concentração final de 5% e acetonitrila numa concentração final de 50%. Os pedaços de gel foram submetidos à agitação por 30 minutos. Após esse tempo, a solução de extração foi removida e adicionada ao tubo com o sobrenadante anterior. Essa operação foi repetida e a solução total foi submetida à secagem no *Speed Vac* para diminuição do volume e concentração dos peptídeos. Os peptídeos resultantes dessa extração foram aplicados na placa para análise por espectrometria de massa.

A matriz utilizada para análise por MALDI-ToF-MS foi uma solução saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila 50%, TFA 0,1%. Foi misturado 1 μ L da solução da matriz com 1 μ L da solução de peptídeos, e 1 μ L dessa mistura depositado em placa de metal do espectrômetro, que foi deixada à temperatura ambiente até secar completamente. Em outros pontos da placa foi depositada também a mistura de padrões peptídicos com massas tríplicas conhecidas para a calibração do espectrômetro de massa tipo MALDI-ToF.

5.14 – Análise por espectrometria de massa

As análises espectrométricas dos peptídeos resultantes da digestão com tripsina, e/ou da extração subsequente quando necessária, foram executadas em espectrômetro MALDI-ToF-ToF Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O método de aquisição utilizado na obtenção dos picos foi o modo tipo refletor para íons com polaridade positiva com calibração externa e uma faixa de detecção de 800-3200 Da. Foi utilizada uma voltagem de aceleração de 20kV. A lista de picos foi gerada usando o programa FlexAnalysis 3.0.

5.15 - Identificação das proteínas

Para a identificação das proteínas foi utilizado o programa MASCOT 2.3 e um banco de dados de sequências de *H. seropedicae* (número de acesso CP002039.1). Foram usadas na identificação as técnicas de PMF (*peptide mass fingerprint*) e MS/MS *ion search*. A identificação foi dada como positiva havendo igualdade/alta similaridade entre os valores das massas trípticas obtidas pelas análises espectrométricas em MALDI-TOF-MS comparada com as massas da digestão teórica (*in silico*) das sequências proteicas do banco de dados. O algoritmo do MASCOT calcula a probabilidade (P) de que o pareamento (*match*) a algum peptídeo no banco de dados é aleatória. O *score* que se obtém é dado por $S = -10 \cdot \log(P)$. Quanto maior o *score* mais confiável é a identificação. Os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) determinados experimentalmente foram comparados com o pI e MM teóricos da identificação. A tolerância para a MM foi de $\pm 10\%$ e os valores de pI foram especificados conforme a faixa de pH utilizada para isoeletrofocalização (pH 4 – 7). A base de dados escolhida foi a sequência genômica de *H. seropedicae*. Foram consideradas as modificações de resíduos de cisteína (carbamidometilação de cisteínas decorrentes do tratamento com iodoacetamida) como modificações fixas e a oxidação de metioninas como modificações variáveis. A tolerância de erro na identificação foi de 100 ppm para PMF e de 0,6 Da para buscas de MS/MS *ion search*. Somente peptídeos e proteínas com *scores* maiores do que o *score* de corte do Mascot ($p < 0,05$) foram considerados como identificações positivas. A figura 3 mostra um esquema ilustrativo das etapas de identificação protéica.

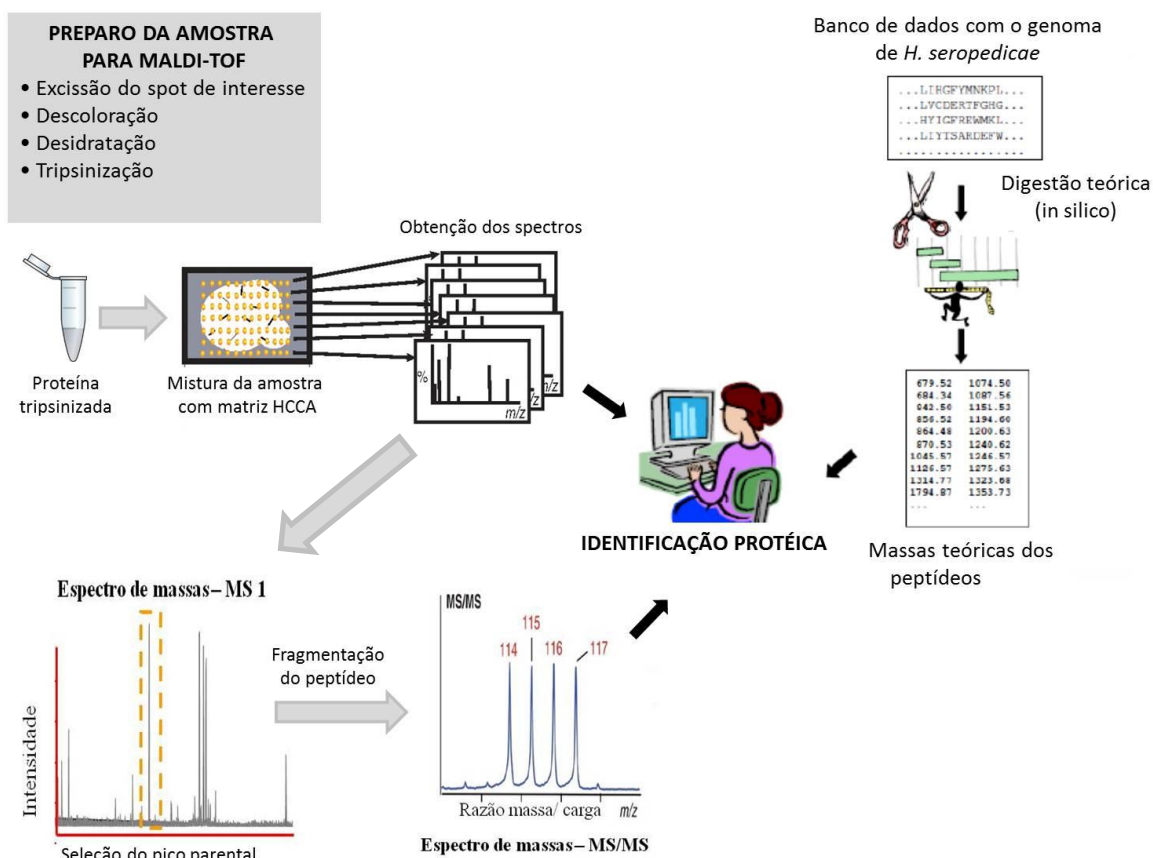


FIGURA 3: ETAPAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA (AUTOR, 2013).

5.16 - Extração de RNA

O RNA total foi obtido a partir de células de *H. seropedicae* cultivadas até uma DO_{600} de 0,6 (7-8 horas de cultivo a 30°C, 120 rpm) na presença ou ausência de 5% de extrato de cana-de-açúcar. O kit RiboPure Bacteria (Applied Biosystems) foi usado para a extração de RNA seguindo recomendações do fabricante. A quantificação do RNA foi mensurada espectrofotometricamente e a pureza do RNA total extraído foi avaliada através da razão de densidade ótica (DO_{260}/DO_{280} nm) usando um espectrofotômetro Nano Drop 2000 (THERMO Scientifics – Massachusetts - USA). Os valores da razão de densidade ótica variaram entre 2,16-2,19. A integridade das amostras de RNA foi confirmada por

eletroforese em gel de agarose.

5.17 - Síntese de cDNA

Para as reações de RT-qPCR, os cDNAs foram sintetizados por transcrição reversa usando o *high-capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems), a partir de no mínimo 2 µg de RNA total em um volume final de 20µL utilizando a enzima transcriptase reversa e oligonucleotídeos aleatórios segundo especificações do fabricante. A figura 4 esquematiza a obtenção do cDNA.

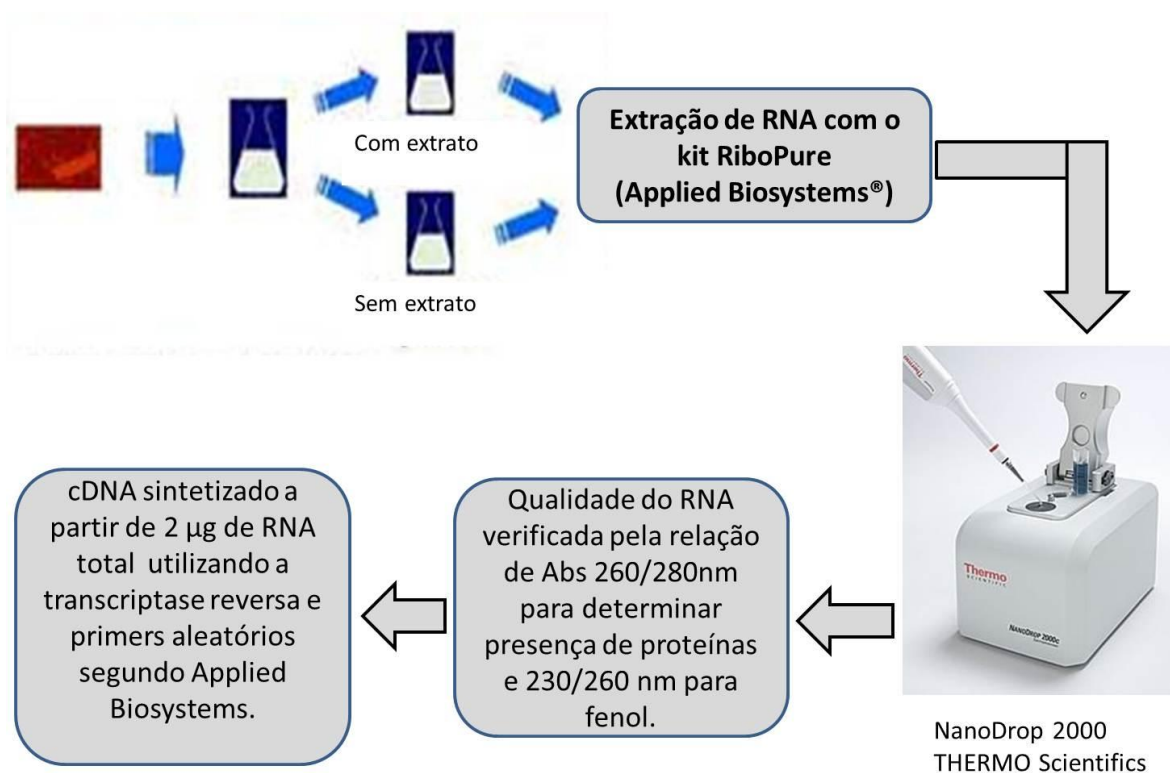


FIGURA 4: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

5.18 – Análise da transcrição diferencial por RT-qPCR

A PCR quantitativa foi utilizada para analisar a expressão diferencial das proteínas identificadas na análise proteômica pelos seus níveis do mRNA e assim ter um dado corroborativo dos dados proteômicos. Oligonucleotídeos específicos para cada gene foram planejados usando o programa Primer Express 3.0. Estes oligonucleotídeos foram usados em reações de PCR utilizando o sistema *Power SYBR-Green PCR Master Mix* em um termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems) com sistema de coleta de dados em tempo real, conforme recomendações do fabricante. A reação continha 3µL de SYBR-Green PCR Master Mix, 0,5µL do oligonucleotídeo direto e 0,5µL do oligonucleotídeo reverso (ambos a 10pmol/µL), 1µL de água livre de RNase, e 1µL de cDNA diluído 100 vezes. Os genes *16SrRNA* e *rpoC* foram utilizados como normalizadores e controles internos da expressão por serem de expressão constitutiva. RQ (expressão gênica relativa) foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os controles negativos para as reações do PCR quantitativo em tempo real usaram o RNA purificado antes do tratamento com a transcriptase reversa, e todas as amostras foram feitas em triplicata. Curvas de calibração para todos os oligonucleotídeos foram lineares em quatro ordens de magnitude ($R^2 = 0.97-0.99$) (Tabela 3).

TABELA 3: OLIGONUCLEOTÍDEOS USADOS PARA A ANÁLISE DE RT-qPCR DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *H.seropedicae*.

Nome da sequência	Sequência 5' - 3'	Gene alvo	R ²	Eficiência (%)
16 S rRNA - FW	TGTCAGGGAAGAAACGGTTTTG	16S rRNA	0.99	95
16 S rRNA - RV	AGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCA			
rpoC - FW	AAGCAAGTCCAGCAAAACGAA	rpoC	0.97	96
rpoC - RV	CCACGAGCGGATCTTGTC			
2211 - fusA FW	TGCCCCTGTCGGAAATGTT	fusA	0.97	92
2211 - fusA RV	AATAGTGCTTGAATTCCATCGAGTAG			
2430 - qor NADPH FW	TATTCCCGCTGGGCTTCTC	qor	0.98	98
2430 - qor NADPH RV	CGCTTGAACGGACCTGTGT			
2663 - rpsA FW	GGGATGAAAGCTTCGGACTTC	rpsA	0.97	90
2663 - rpsA RV	GTCGTGCGCCTGGATCAC			
2692 - fliC FW	ACAGCCAGTTCACGCATACG	fliC	0.97	95
2692 - fliC RV	GGTATCTCGATGGCGCAAAC			
2708 - tufB FW	TCACACCCCGTTCTTCAACA	tufB	0.97	98
2708 - tufB RV	TCCTTGTCCTTCGGCAGTTC			
2713 - purH FW	AATTCCTGGAAGTGCTGATTGC	purH	0.97	93
2713 - purH RV	GTGCCCAGCGGGATTTC			
2719 - gltD FW	CGGGCACTTCGACCATCT	gltD	0.98	92
2719 - gltD RV	GACCACCAAGCGTCTGGAA			
2733 - NAD FW	AGCTGGAAAGCCGTGAACA	Hsero_0147	0.97	96
2733 - NAD RV	GAGATCCTGGTTGCCTTGCA			
2766 - glmU FW	GCAACTTCGTCGAGGTCAAGA	glmU	0.97	90
2766 - glmU RV	CCGTCGTAGTTGCAGGTGATC			
2810 - mreB FW	ACCGAGCAGATGTTGAAGCA	mreB	0.97	88
2810 - mreB RV	CAGGGCACGCAGATGATG			
2875 - dapA FW	GGGCACGTTGTACAGGATCA	dapA	0.97	90
2875 - dapA RV	CTACCCAGGAAGGCATGTACCT			
2887 - suhB FW	GGCGATCGAGACGCAGTATT	suhB	0.99	90
2887 - suhB RV	GATGAAAACGAGAACGTCTGGAT			
2937 - gmpA FW	CAAGTACCTGGACGGCATCA	gmpA	0.98	89
2937 - gmpA RV	AGGTCGGCGTCCAGTTCATA			
2947 - thiE FW	GCGAGTTACGTCGCCTTTG	thiE	0.97	95
2947 - thiE RV	CTTGGAGTGCGCAATGATTTC			
2954 - phbB FW	CCTTGGCGGTGGAGTAGTTG	phbB	0.97	90
2954 - phbB RV	GCGAGCGCGGTTTCG			
2897 - mdh FW	CATGTACGCCGACTACCGTTT	mdh	0.99	93
2897 - mdh RV	TCTTGTTCCATTCTGGTCGTT			

A amplificação do qPCR foi executada usando *Power SYBR-Green PCR Master Mix on a Step One Plus Real Time-PCR System* (Applied Biosystems). Curvas de calibração para todos os oligonucleotídeos foram lineares por no mínimo quatro ordens de magnitude. Eficiência é dada como percentuais e foram de 88% ou mais. R² é a curva linear padrão que neste experimento foram >0,97

5.19 Ensaios de adesão das estirpes de *H. seropedicae* às raízes de cana-de-açúcar

As estirpes bacterianas selvagens (SmR1) e mutante para o gene *rfbB* (gene da via de biossíntese de lipopolissacarídeos) foram cultivadas na presença e ausência do extrato de cana-de-açúcar (5%) como conduzido nos demais experimentos. As células de *H. seropedicae* foram coletadas por centrifugação e lavadas com salina estéril (0,9% de NaCl). A inoculação foi com 10^5 unidades formadoras de colônias das estirpes selvagens e mutante de *H. seropedicae* por 15 minutos com as amostras de raiz (aproximadamente 0,05 g de peso fresco de raiz) de cana-de-açúcar B-4362 esterilmente cultivadas. Logo após o tempo de inoculação as raízes foram cortadas, pesadas e lavadas duas vezes por imersão em solução salina estéril (NaCl 0,9%), e então vortexadas vigorosamente por 30 segundos em 1 mL da mesma solução. O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias aderidas por grama de raiz fresca de cana-de-açúcar através de diluição seriada e contagem em meio sólido. Os resultados reportados representam a média de pelo menos três replicatas independentes.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Perfil de crescimento de *H. seropedicae* em extrato de cana-de-açúcar.

Para verificar se a expressão gênica de *Herbaspirillum seropedicae* é controlada por componentes do extrato de cana-de-açúcar, a bactéria foi cultivada na presença de 5% de extrato de cana-de-açúcar. O perfil de crescimento de *H. seropedicae* na ausência e presença do extrato foi muito similar (Figura 5) com uma taxa máxima de crescimento de $\mu_{\max} = 0.558 \pm 0.083 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{\max} = 0.597 \pm 0.023 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, a figura 5 mostra que a cultura cultivada na presença de cana-de-açúcar apresentou uma fase lag mais curta. É possível que este efeito tenha sido devido a presença de fatores de crescimento adicionais no extrato de cana-de-açúcar, tais como vitaminas, ausentes no meio JNFb-malato.

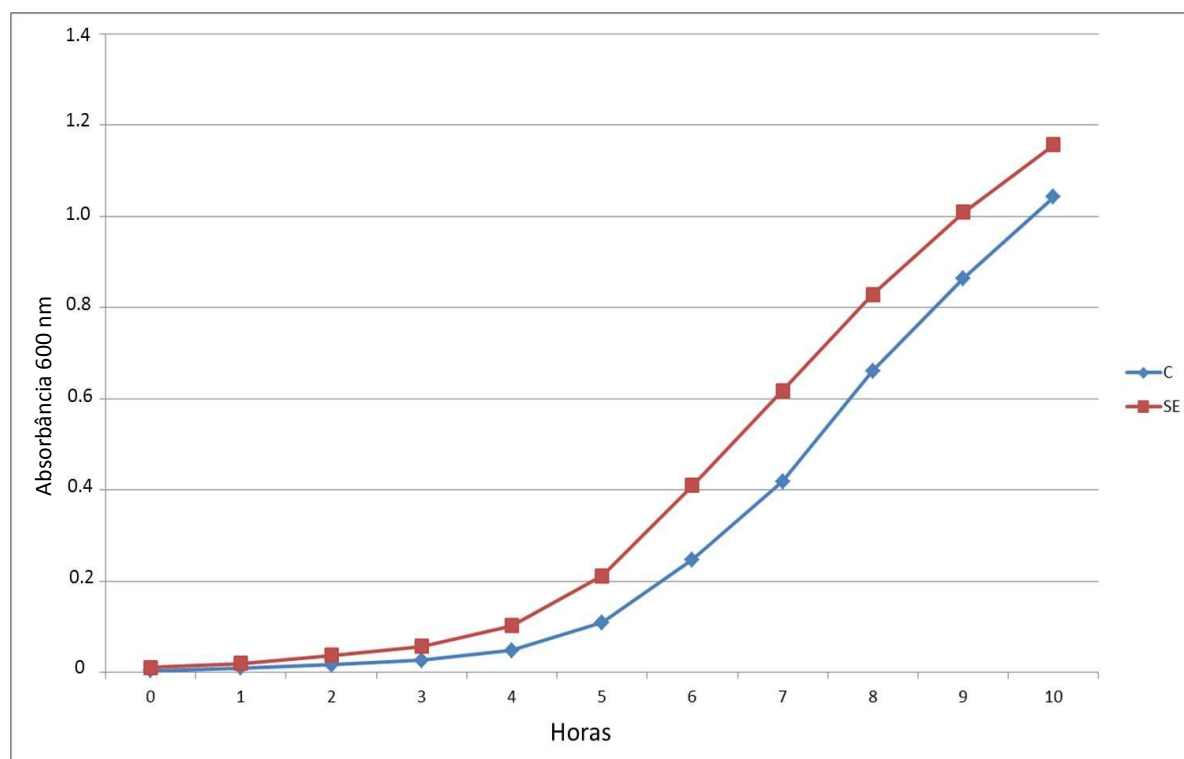


FIGURA 5: CURVAS DE CRESCIMENTO DE *H. seropedicae* CULTIVADO NA AUSÊNCIA (C) E NA PRESENÇA (SE) DE 5% EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

6.2 Eletroforese bi-dimensional de proteínas de *H. seropedicae* cultivado na presença e ausência de extrato de cana-de-açúcar

As células para extração de proteínas para análise proteômica foram coletadas na fase exponencial de crescimento quando a cultura alcançou absorbância a 600 nm de 0,6. Para isto foram realizados três cultivos independentes para cada condição e as proteínas isoladas como descrito em material e métodos. O rendimento de proteína foi em média 300 mg para cada 100 ml de cultura. As proteínas das amostras foram separadas em um gradiente linear de pH de 4 a 7 e a segunda dimensão foi em um gel de poliacrilamida (10,5%) desnaturante na presença de SDS. Os géis foram corados pelo método *Coomassie* coloidal. Para cada amostra foram obtidos três géis bi-dimensionais, totalizando 9 géis para cada condição. Na figura 6 é mostrado um gel de cada replicata biológica obtida.

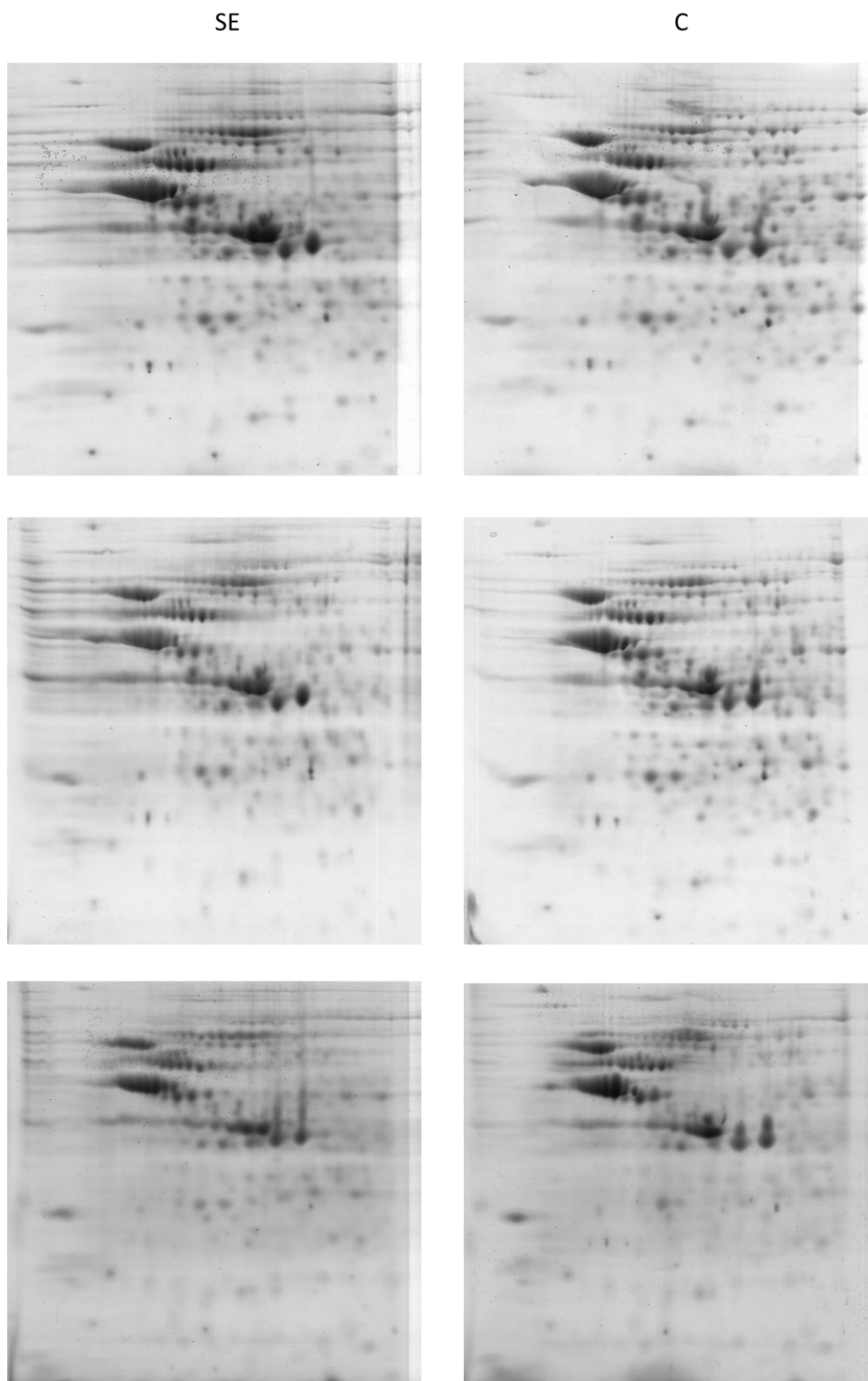
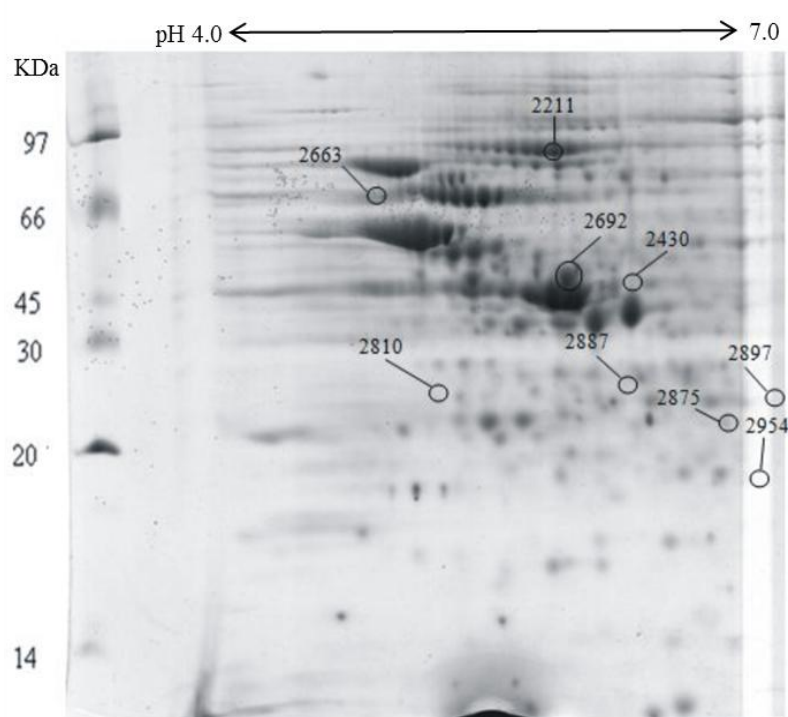


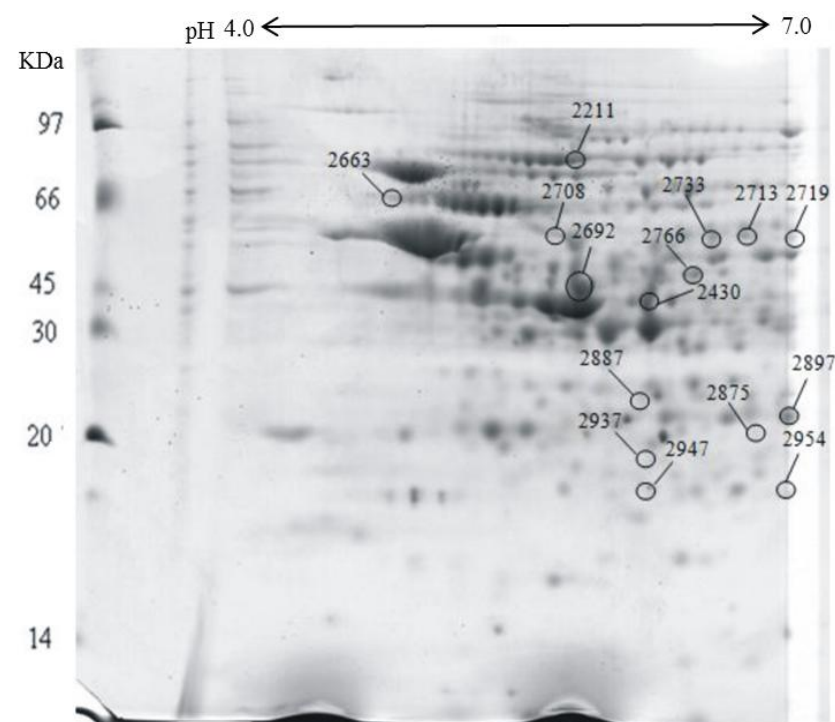
FIGURA 6 – GÉIS BIDIMENSIONAIS REPRESENTATIVOS OBTIDOS DAS CULTURAS DE CÉLULAS CULTIVADAS NA PRESENÇA (SE) E AUSÊNCIA (C) DO EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR. Os géis foram obtidos em triplicatas técnicas de triplicatas biológicas, com pelo menos 9 géis de cada condição. Tira de separação por IEF pH 4-7, géis 10,5% corados com Coomassie G-250.

6.3 Análise dos eletroforetogramas bi-dimensionais.

A análise dos géis bi-dimensionais usando o programa Imagemaster (GE Healthcare) permitiu a detecção de uma média de 402 bandas proteicas nos extratos de *H. seropedicae* cultivado na ausência de cana-de-açúcar e de 380 bandas na presença de extrato. A comparação do padrão dos géis 2D-PAGE de *H. seropedicae* cultivado na presença ou ausência do extrato de cana-de-açúcar permitiu a detecção de bandas de proteínas diferencialmente expressas de *H. seropedicae*. Os eletroferogramas de referência (gel master do Imagemaster) de *H. seropedicae* cultivado na ausência (C) ou presença do extrato de cana-de-açúcar (SE) são mostrados na Figura 7, destacando as proteínas diferencialmente expressas cuja posterior identificação foi possível. Das cerca de 400 bandas proteicas em cada condição, 30 representaram proteínas diferencialmente expressas (considerando a intensidade da banda pelo menos 1,5 vez maior ou menor). A figura 8 mostra os pontos protéicos em zoom. A figura 9 mostra o gráfico com as alterações de volume das proteínas diferencialmente expressas. A análise estatística (teste de Student) mostrou que as diferenças em intensidade das bandas foram estatisticamente significativas ao nível de 5% ($p < 0,05$).



SE



C

FIGURA 7: GÉIS BIDIMENSIONAIS ILUSTRATIVOS DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE *H. seropedicae* CULTIVADOS NA AUSÊNCIA (C) E PRESENÇA (SE) DE 5% DE EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR. Os géis bidimensionais das proteínas extraídas de *H. seropedicae* cultivadas na presença (SE) ou ausência (C) de 5% de extrato de cana-de-açúcar. Proteínas com aumento de expressão na presença do extrato de cana-de-açúcar são 2211, 2663, 2692, 2887 e 2875; proteínas com expressão diminuída na presença do extrato de cana-de-açúcar são 2430, 2954 e 2897; o spot 2810 está presente exclusivamente nas células cultivadas na presença do extrato; as bandas proteicas 2708, 2947, 2733, 2937, 2766, 2719 e 2713 não foram detectadas nos extratos de células cultivadas na presença de 5% de extrato de cana-de-açúcar.

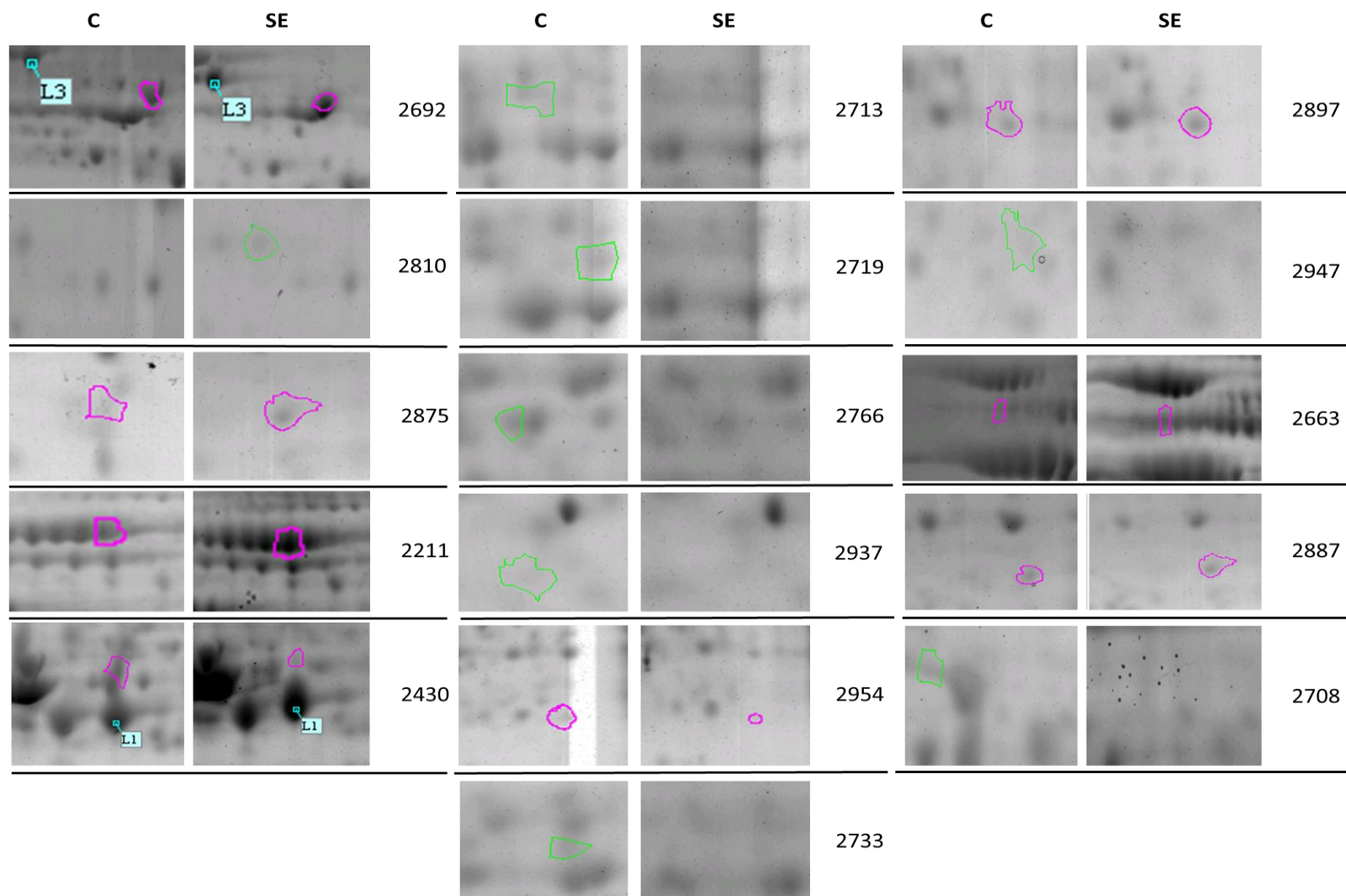


FIGURA 8- ZOOM DOS PONTOS PROTÉICOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

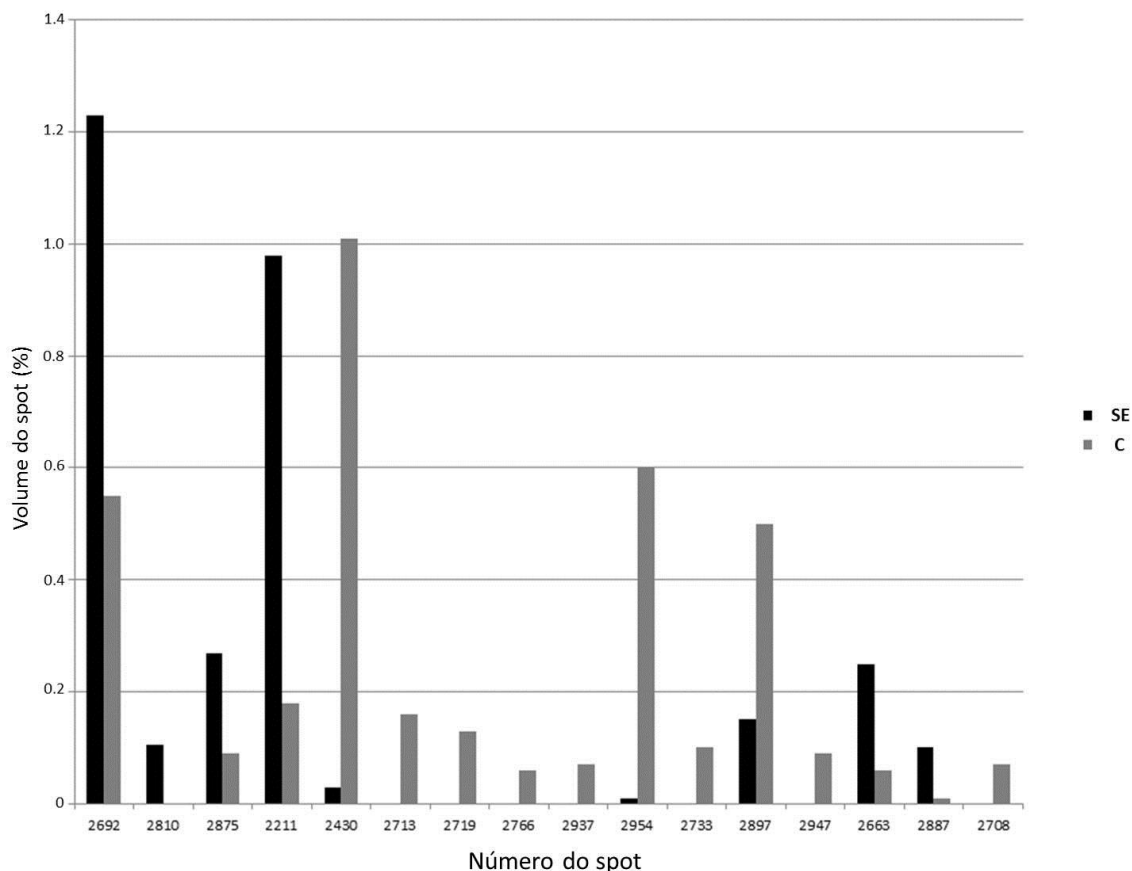


FIGURA 9: PERCENTUAIS DOS VOLUMES DAS BANDAS PROTÉICAS (SPOTS) CALCULADAS A PARTIR DOS GÉIS 2D DE CADA CONDIÇÃO USANDO O SOFTWARE IMAGEMASTER 6.0.

6.4 Identificação das proteínas diferencialmente expressas de *H. seropedicae*

Todas as 30 bandas protéicas diferencialmente expressas foram retiradas do gel, digeridas com tripsina e os produtos de digestão analisados em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF. Essas proteínas são provavelmente envolvidas na adaptação de *H. seropedicae* à presença da planta. Um total de 16 bandas diferenciais foram identificadas (Tabela 4). A tabela 5 mostra dados suplementares da identificação de proteínas.

TABELA 4: IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae* CULTIVADA NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

Spot ID	<u>pI/Mr (KDa)</u> Teórico Experim.		Escore proteína	Número de acesso	Descrição da proteína	Mudança de expressão ¹	Teste t (valor p)	Seq. peptídeos MS/MS (ion score)
2692	5,5 / 37,3	5,7 / 43	110	Hsero_2070	FliC flagelina; filamento estrutural	1,55	0,01	TLNDEYTQLSQEVFR (119)
2810	5,2 / 37	5,3 / 36	78	Hsero_4662	MreB actina ATPase envolvida na morfogênese celular	Presente ²		- ⁵
2875	6,0 / 31,6	6,6 / 30	54	Hsero_3276	DapA dihidrodipicolinato sintase	2,09	0,05	LPLAPLGAAYHDTVFR (26)
2211	5,3 / 78	5,1 / 77	78	Hsero_0111	FusA fator de elongação G1 (EF-G1)	2,52	0,05	VTLFFGSYHDVDSNENAFR (51)
2430	5,6 / 36,2	6,0 / 45	158	Hsero_3499	Qor NADPH:quinona oxidoreductase	-3,82	0,05	VHAVGLNPPDWYLR (64) AYAQYVSVAAASEIALKPQR (35)
2713	5,9 / 56,4	6,4 / 59	100	Hsero_0415	PurH enzima bifuncional: fosforibosil aminoimidazol carboxamida formiltransferase/IMP ciclohidrolase transmembrana	Ausente ³		-
2719	6,3 / 53,6	6,6 / 53	86	Hsero_3923	GltD glutamato sintase (subunidade pequena) oxidoreductase	Ausente		-
2766	5,8 / 47,4	6,1 / 52	86	Hsero_4423	GlmU UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase	Ausente		-
2937	5,9 / 27,7	6,0 / 28	74	Hsero_0163	GpmA 2,3- bifosfoglicerato dependente fosfoglicerato mutase	Ausente		-
2954	6,7 / 26,5	6,7 / 26	72	Hsero_2998	PhbB acetoacetyl CoA redutase	-5,09	0,05	-
2733	5,8 / 55,6	6,2 / 57	50	Hsero_0147	NAD-dependente desidrogenase	Ausente		-
2897	6,2 / 35,4	6,6 / 32	ND ⁴	Hsero_2976	Mdh malato desidrogenase	-2,14	0,05	IVQGLEIDEFSQER (35)
2947	5,6 / 23	5,9 / 27	ND	Hsero_0430	ThiE tiamina monofosfato sintase	Ausente		DGASYVAFGGFYPSR (24)
2663	5,2 / 63	5,1 / 64	ND	Hsero_3689	RpsA 30s subunidade ribossomal S1	2,58	0,01	GAVIQLTDEVEGYLR (30)

2887	5,5 / 28	5,6 / 33	ND	Hsero_1723	SuhB inositol monofosfatase (supressor extragênico)	2,09	0,02	GIITQAVVYDPTR (30)
2708	5,4 / 43	5,6 / 53	ND	Hsero_0097	TufB EF-Tu fator de alongação	Ausente		LLDQGQAGDNVGVLLR (50)

1- Mudança de expressão foi calculada a partir da média dos volumes das bandas normalizados de no mínimo três géis 2D de cada condição; valores positivos indicam aumento do volume da banda proteica nas células cultivadas na presença do extrato de cana-de-açúcar e valores negativos indicam diminuição do volume da banda proteica.
2- Presente exclusivamente nas células cultivadas na presença do extrato de cana-de-açúcar;
3- Presente exclusivamente nas células cultivadas na ausência do extrato de cana-de-açúcar.
4- ND – proteínas identificadas somente por MS/MS.
5- Não foi possível a fragmentação de picos parentais e identificação das proteínas por MS/MS.

TABELA 5- DADOS SUPLEMENTARES DA IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.

Número de acesso	Nome da proteína	Variação da banda protéica	Precursor MS/MS ¹	Seq. Peptídeos identificados MS/MS (íon score)	Cobertura MS/ MS ²	Peptídeos Buscados/pareados ³
Hsero_2070	FliC flagelina; filamento estrutural	1,55	1842.95	TLNDEY TQLSQEVFR (119)	29% / 4%	19 / 9
Hsero_4662	MreB actina ATPase envolvida na morfogênese celular	Presente			21%	16 / 7
Hsero_3276	DapA dihidrodipicolinato sintase	2,09	1593.92	LPLAPLGAAYHDTV R (26)	25% / 5%	13 / 5
Hsero_0111	FusA fator de elongação G1 (EF-G1)	2,52	2218.257	VTLFFGSYHDVDSNENAF R (51)	14% / 2%	15 / 9
Hsero_3499	Qor NADPH:quinona oxidoreductase	-3,82	1637.187 1899.38	VHAVGLNPPDWYLR (64) AYA QYVSVAASEIALKPQR (35)	38% / 5%	16 / 11
Hsero_0415	PurH enzima bifuncional: fosforibosil aminoimidazol carboxamida formiltransferase/IMP ciclohidrolase transmembrana	Ausente			21%	9 / 7
Hsero_3923	GltD glutamato sintase (subunidade pequena) oxidoreductase	Ausente			21 %	12 / 7
Hsero_4423	GlmU UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase	Ausente			31%	28 / 8
Hsero_0163	GpmA 2,3- bifosfoglicerato dependente fosfoglicerato mutase	Ausente			27%	9 / 5
Hsero_2998	PhbB acetoacetil CoA redutase	-5,09			35%	11 / 5
Hsero_0147	NAD-dependente desidrogenase	Ausente			13%	9 / 4
Hsero_2976	Mdh malato desidrogenase	-2,14	1662.806	IVQGLEIDEFSQER (35)	- /4%	
Hsero_0430	ThiE tiamina monofosfato sintase	Ausente	1593.729	DGASYVAFGGFYPSR (24)	- /7%	
Hsero_3689	RpsA 30s subunidade ribossomal S1	2,58	1662.869	GAVIQLTDEVEGYLR (30)	- /2%	
Hsero_1723	SuhB inositol monofosfatase (supressor extragênico)	2,09	1432.746	GIITQAVVYDPTR (30)	- /4%	
Hsero_0097	TufB EF-Tu fator de elongação	Absent	1590.736	LLDQGGAGDNVGVLLR (50)	- /8%	

			1667.86 1788.855			
--	--	--	---------------------	--	--	--

1: Íon selecionado para fragmentação; 2: Percentual de cobertura MS/MS2; 3: número de peptídeos buscados e pareados na busca de impressão digital de peptídeos (PMF).

Destas 16 bandas protéicas identificadas, 1 banda estava presente exclusivamente em bactérias cultivadas na presença do extrato de cana-de-açúcar, 7 ausentes em bactérias cultivadas na presença do extrato de cana-de-açúcar, 5 com a expressão aumentada e 3 com expressão diminuída na presença de 5% do extrato de cana-de-açúcar (Tabela 4 e Figura 7). Assim, o extrato foi capaz de induzir ou reprimir a expressão de genes específicos de *H. seropedicae*.

As proteínas diferencialmente expressas foram divididas em dois grupos: proteínas relacionadas com vias metabólicas e proteínas provavelmente envolvidas na interação planta-bactéria.

6.4.1 Proteínas relacionadas com vias metabólicas

Doze proteínas diferencialmente expressas de *H. seropedicae* cultivado na presença do extrato de cana-de-açúcar estão envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, cofatores e vitaminas (PurH - enzima bifuncional transmembrana fosforibosil aminoimidazol carboxamida formil transferase/inosina monofosfato ciclohidrolase e ThiE - tiamina monofosfato sintase (GOTS *et al.*, 1977; RAPALA-KOZIK *et al.*, 2007), assimilação de amônia (GltD - glutamato sintase oxidoreductase) (TYLER, 1978; GAREL *et al.*, 1990), metabolismo de carboidratos (GlmU UDP N-acetilglucosamina pirofosforilase, GpmA 2,3-bifosfoglicerato-dependente fosfoglicerato mutase e SuhB - inositol monofosfatase) (MIO & YABE, 1998), metabolismo energético (NAD-dependente desidrogenase , Mdh - malato desidrogenase, Qor - NADPH:quinona oxidoreductase) (MELO & BANDEIRAS, 2004), metabolismo protéico (FusA – fator de alongação G1), metabolismo de ácido graxos (acetoacetil-CoA redutase) e biossíntese de aminoácidos (DapA – dihidropicolinato sintase) (RENEWICK *et. al.*, 2005), sugerindo que a adaptação ao hospedeiro leva a uma

considerável mudança metabólica como resultado da disponibilidade de uma nova gama de nutrientes no extrato de cana-de-açúcar. Todas essas proteínas foram previamente identificada no mapa proteômico de *H. seropedicae* SmR1 (CHAVES et al., 2007).

A enzima PurH é uma enzima bifuntional (enzima bifuncional transmembrana fosforibosil aminoimidazol carboxamida formil transferase/inosina monofosfato ciclohidrolase) que foi uma das sete somente encontrada quando *H. seropedicae* foi cultivado na ausência de extrato de cana-de-açúcar. PurH catalisa os dois passos finais na biossíntese de IMP (ZHANG *et al.*, 2008), convertendo 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR) para 5-fosforibosil -5-formaminoimidazol-4-carboxamida (FAICAR), e depois para inosina monofosfato (IMP). Genes envolvidos na biossíntese *de novo* de purinas são responsáveis pelo processo de virulência em animais e patógenos de plantas tais como *Salmonella* (McFARLAND & STOCKER, 1987), *Streptococcus pneumoniae* (POLISSI et al., 1998), *Vibrio vulnificus* (KIM *et al.*, 2003), *Xanthomonas oryzae* (CHATTERJEE & SONTI, 2005) e *Bacillus anthracis* (JENKINS *et al.*, 2011). O metabolismo de purinas também parece ser importante para simbiose, uma vez que a auxotrofia de purinas em *Rhizobium spp.* leva à formação de pseudonódulos (BUENDIA-CLAVERIA *et al.*, 2003; NEWMAN *et al.*, 1994; NOEL *et al.*, 1988; SWAMYNATHAN & SINGH, 1992). Já que a enzima purH catalisa a conversão de AICAR em FAICAR e inosina, a inativação do gene *purH* em *Mesorhizobium loti* causou um acúmulo de AICAR e nódulos (OKAZAKI *et al.*, 2007). Uma vez que AICAR regula negativamente a expressão de *fixNOPQ* (codifica para uma oxidase terminal de três subunidades contendo citocromo *b* e *c*, denominada citocromo terminal oxidase *cbb3*) de *Rhizobium etli* (SOBERÓN *et al.*, 1997), o fenótipo Fix negativo pode ser explicado pela ausência da citocromo oxidase terminal de alta afinidade *cbb3*. Esta oxidase é codificada pelos genes

fixNOPQ e é necessária para fixação de nitrogênio por *Rhizobium etli* (SOBERÓN *et al.*, 1997). A ausência da proteína purH quando as células cresceram sem o extrato de cana-de-açúcar pode indicar que purinas são abundantes no extrato levando à baixa expressão dessa enzima quando as células de *H. seropedicae* estava em um ambiente rico de purina.

A proteína GltD - glutamato sintase (subunidade pequena) não foi detectada nas células de *H. seropedicae* crescendo na presença de extrato de cana-de-açúcar. GltD - glutamato sintase (GOGAT) é envolvida nos estágios iniciais da assimilação de amônio catalizando a reação de transaminação de glutamina para α -cetoglutarato para formar duas moléculas de glutamato usando NADPH como doador de elétrons (BENAN *et al.*, 2011). A via glutamina sintetase/glutamato sintase (GS-GOGAT) é responsável pela assimilação de amônio em Proteobacteria e usualmente é mais ativa sob condições limitantes de nitrogênio (REITZER, 2003). Em *Escherichia coli*, a expressão do operon *gltBD* não é regulada por amônio, mas reprimida na presença de glutamato (GOSS *et al.*, 2001). Embora a regulação do operon *gltBD* não tenha sido estudada ainda em *H. seropedicae*, a repressão de GltD na presença do extrato de cana-de-açúcar pode ser devido à presença de glutamato no extrato (WALFORD, 1996) (Tabela 6).

Curiosamente, uma cepa de *Rhizobium etli* com a mutação no gene *gltB* da subunidade grande de GOGAT levou a um aumento da secreção de amônio para a planta, transporte para as folhas e acúmulo de nitrogênio nas sementes (CASTILLO *et al.*, 2000). Esse resultado levanta a possibilidade de que a diminuição de expressão de GOGAT em *H. seropedicae* exposto ao extrato de cana-de-açúcar pode também facilitar a secreção do nitrogênio fixado pela bactéria endofítica para a planta. A glutamina sintetase (GS), responsável pela condensação do glutamato e amônia para formar glutamina, não foi identificada como proteína diferencialmente expressa em nosso estudo. Esse resultado foi

esperado uma vez que o nível de amônio é o principal fator que regula a expressão de GS em *H. seropedicae*. A presença de uma alta concentração de NH₄Cl (20mM) nestes experimentos resultaria uma regulação negativa de *glnA* e inibição da atividade de GS por adenilação (CHAVEZ *et al.*, 2007; CHUBATSU *et al.*, 2012).

A tabela 6 mostra a composição do extrato de cana-de-açúcar obtido por Walford (1996). O extrato de cana-de-açúcar, portanto, possui uma gama de componentes que podem ser fundamentais para a benéfica interação com bactérias endofíticas. A análise de extrato de folhas, suco e bagaço de cana-de-açúcar por TLC (*thin-layer chromatography*) e HPLC (*High-performance liquid chromatography*) revelou a presença de vários flavonóides. O conteúdo de flavonóides das folhas de cana-de-açúcar e bagaço (cerca de 1,70 e 0,38 mg de flavonóide/grama de material vegetal fresco, respectivamente) (COLOMBO *et al.*, 2006). Esse conteúdo foi consideravelmente alto em comparação com outras fontes de flavonóides reportadas na literatura como maçãs (0,98 – 1,43 mg de flavonóide/g de material da planta fresca) (EBERHARDT *et al.* 2000); cebola (0,71-0,80 mg de flavonóide/g matéria fresca) (RHODES & PRICE, 1996); tomate (0,005 – 0,03 mg de flavonóide/g de matéria fresca) (WILLCOX *et al.* 2003).

TABELA 6: COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DA CANA-DE-AÇÚCAR (WALFORD, 1996).

		% Brix ¹	
Açúcares	Sacarose	81-87	
	Açúcares redutores	3-6	
	Oligossacarídeos	0,06-0,6	
	Polissacarídeos	0,2-0,8	
Sais	Sais inorgânicos	1,5-3,7	
Não açúcares orgânicos	Ácidos orgânicos	0,7-1,3	Ác.Oxálico – 40-200 (ppm/Bx) Ác.Cítrico – 900-1800 (ppm/Bx) Ác.Málico - 1200-800(ppm/Bx) Ác.Aconítico-5000-8000 (ppm/Bx) Ác.succínico-100-200 (ppm/Bx)
	Aminoácidos	0,5-2,5	Aminoácidos livres (%) Aspartato – 0,11 Alanina – 0,06 Glutamato – 0,05 Valina – 0,03 Treonina – 0,02 Isoleucina – 0,01 Glicina - <0,01 Todos os outros - traços
	Dextranas	0,1-0,6	
	Amido	0,11-0,5	
	Corantes	0,1	
	Gorduras e fosfolipídios	0,05-0,15	
Insolúveis	bagaço	0,15-1	

1- Brix – abrev. Bx - Escala de densidade relativa (gramas por 100 mL de água) usada para indicar o peso de sólidos em 100 gramas de extrato de cana-de-açúcar.

As proteínas GlmU (UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase, GpmA (2,3-bifosfoglicerato-dependente fosfoglicerato mutase) e NAD-dependente desidrogenase mostraram-se ausentes em *H. seropedicae* cultivado na presença do extrato de cana-de-açúcar. GlmU catalisa as duas últimas reações sequenciais na biossíntese *de novo* de UDP-GlcNAc (conversão de Glc-N-1-P para GlcANAc-1-P para UDP-GlcNAc). Em bactérias, UDP-GlcNAc é usada na síntese de peptídeo-glicano (BARRETEAU *et al.*, 2008) e lipopolissacarídeos (LPS) (WANG & QUINN, 2010), ambos atuam como elicitores do sistema imune das plantas, e tem sido chamados de padrões moleculares associados a micróbios – MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) (ERBS & NEWMAN, 2012). Os LPS desempenham um importante papel na ligação de *H. seropedicae* às raízes de milho. Alterações na estrutura do LPS inibem a ligação da bactéria à superfície da raiz (BALSANELLI *et al.*, 2010). Além disso, descobriu-se que genes de *H. seropedicae* envolvidos na biossíntese de LPS e de exopolissacarídeos são regulados por naringenina (TADRA-SFEIR *et al.*, 2011). Uma vez que o LPS é necessário para a adesão eficiente de *H. seropedicae* em raízes de milho (BALSANELLI *et al.*, 2010), foi testado neste trabalho a capacidade de estirpes selvagens e mutantes *rfbB* (LPS negativo) para aderir às raízes da cana-de-açúcar B-4362. Os resultados mostraram uma redução de aproximadamente 100 vezes nas bactérias aderidas mesmo quando crescidas na presença ou ausência do extrato de cana-de-açúcar (Figura 12), indicando que LPS é importante para a adesão de *H. seropedicae* às raízes de cana-de-açúcar e que a repressão de GlmU pelo extrato não aboliu a síntese de LPS. Nós hipotetizamos que a repressão de GlmU é parte da resposta da bactéria aos componentes do extrato de cana-de-açúcar que levou à modulação de LPS e síntese de peptídeo-glicanos para evitar a elicitação da defesa da planta.

A enzima GpmA catalisa a conversão de 2-fosfoglicerato para 3-fosfoglicerato, sugerindo que a presença do extrato de cana-de-açúcar está inibindo a glicólise. A repressão do metabolismo de carboidrato foi também observada durante a interação entre *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar (dos SANTOS *et al.*, 2010). Neste trabalho, dos Santos *et al.*, (2010) identificaram repressão da expressão de proteínas do metabolismo de carboidratos: enolase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e fosfoglicomutase. A função de NAD-dependente desidrogenase não é conhecida.

A proteína acetoacetyl-CoA redutase (metabolismo de ácidos graxos) foi encontrada em menores quantidades nas células cultivadas na presença de extrato de cana-de-açúcar. Essa proteína pertence à família desidrogenases/redutases de cadeia curta (SDR) e é relacionada à biossíntese de poli-hidroxi-butirato (REDDY *et al.*, 2003). Em *Ralstonia eutropha* H16, a expressão do gene *phaB3* (que codifica acetoacetyl-CoA redutase) parece ser reprimida em meio rico e meio mínimo contendo óleo de planta (BUDDE *et al.*, 2010). É possível que a disponibilidade de nutriente no extrato de cana-de-açúcar possa inibir a produção de PHB em *H. seropedicae* na fase exponencial de crescimento. Entretanto, a validação por RT-qPCR não foi similar com a quantificação pelo gel, já que o método não indicou diferenças na expressão, enquanto que o volume da banda correspondente a acetoacetyl-CoA redutase foi diminuída cinco vezes (Tabela 4). Esta discrepância pode ser devido à regulação pós-traducional.

As bandas correspondentes às enzimas Mdh malato desidrogenase e Qor NADPH:quinona oxidoreductase foram encontradas em menor intensidade nas células cultivadas na presença do extrato de cana-de-açúcar. Essas proteínas estão envolvidas no metabolismo energético, sugerindo que na presença do extrato da planta, *H. seropedicae* ajusta seu metabolismo energético para se adaptar a nova condição ambiental.

A enzima DapA dihidropicolinato sintase teve sua expressão aumentada quando as células de *H. seropedicae* cresceram na presença de extrato de cana-de-açúcar. Trata-se de uma enzima chave na biossíntese de lisina em bactérias e plantas. Ela tem sua atividade inibida retroalimentarmente por lisina (COX, 1995). O fato de não ter sido constatada a presença de lisina no extrato de cana (WALFORD, 1996) pode justificar o aumento de expressão dessa enzima quando *H. seropedicae* teve a presença de extrato de cana-de-açúcar.

A proteína SuhB inositol monofosfatase (supressor extragênico) teve sua expressão aumentada quando as células de *H. seropedicae* foram cultivadas na presença de extrato de cana-de-açúcar. Essa enzima é responsável por desfosforilar inositol fosfato a inositol como parte da via de sinalização de fosfatidilinositol que é envolvido na transdução de sinais em mamíferos e plantas (DRØBAK, 1992). O gene *suhB* de *Burkholderia cenocepacia* é requerido para a secreção de proteínas, formação de biofilme, motilidade e resistência ao antibiótico polixina B (ROSALES-REYES *et al.*, 2012). O extrato de cana de açúcar foi capaz de fazer com que esse importante gene possivelmente envolvido em sinalização celular, formação de biofilme e motilidade tivesse sua expressão aumentada.

6.4.2 Proteínas envolvidas na interação planta-bactéria

Quatro proteínas diferencialmente expressas podem estar relacionadas na interação de *H. seropedicae* com a planta: RpsA, MreB, FliC e EF-TU. Duas dessas, EF-TU e FliC, são também MAMPS (*microbe associated molecular patterns*). MAMPS são moléculas microbio-específicas que são reconhecidas pelo sistema imune inato da planta através da ação dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (ERBS & NEWMAN, 2012). As respostas de defesa induzidas por MAMPS são coletivamente referidas como MTI (MAMP

triggered immunity) e muito pouco é conhecido sobre a sinalização da resposta imune em raízes, onde a maioria dos microrganismos benéficos para as plantas residem. Para que se estabeleça uma interação mutualística com a planta, os microrganismos benéficos precisam lidar com o sistema imune da planta que responde localmente nas raízes sobre a percepção da MAMP (ZAMIOUDIS & PIETERSE, 2012).

A proteína ribossomal S1 30S (RpsA) teve sua expressão aumentada na presença do extrato de cana-de-açúcar. RpsA interage com uma sequência de mRNA durante a iniciação do complexo de tradução, regulando a iniciação da tradução (KOMAROVA *et al.*, 2002). A expressão de RpsA é regulada em outras associações entre plantas e bactérias, por exemplo, em *G. diazotrophicus* a expressão de RpsA foi diminuída quando as células foram cultivadas por sete dias com plântulas de cana-de-açúcar SP70-1143 (dos SANTOS *et al.*, 2010). Por outro lado, a expressão de RpsA aumentou quando células de *G. diazotrophicus* foram co-cultivadas por somente 24 horas com cana-de-açúcar SP70-1143 (LERY *et al.*, 2008). Em consonância com esses dados, também foi observado o aumento de expressão de RpsA de *H. seropedicae* depois de uma curta exposição (7-8 horas) ao extrato de cana-de-açúcar.

Tomados juntos, esses resultados sugerem que a expressão de RpsA de diazotrofos endofíticos pode ser diferentemente regulada dependendo do estágio da interação e tempo de exposição à cana-de-açúcar.

A banda protéica 2810, expressa exclusivamente na presença do extrato de cana-de-açúcar, foi identificada como a proteína MreB. Essa proteína é homóloga da actina bacteriana que é essencial para a segregação cromossômica, manutenção do formato celular, localização de várias proteínas bacterianas, montagem de novos peptideoglicanos e motilidade bacteriana de superfície (GITAI *et al.*, 2005; LEAVER *et al.*, 2005; DYE *et al.*,

2005; KRUSE *et al.*, 2005; DIVAKARUNI *et al.*, 2007). Em *Myxococcus xanthus*, MreB forma filamentos helicoidais de citoesqueleto, e a inibição da polimerização de MreB causou uma inibição na motilidade de *M. xanthus*, sugerindo que MreB pode ser necessário para a localização celular de proteínas de motilidade (MAURIELLO *et al.*, 2010). MreB também parece desenvolver um papel na localização do *pili* tipo IV e motilidade celular *pilus*-dirigida em *Pseudomonas aeruginosa* (COWLES & GITAI, 2010). O *pilus* tipo IV de *P. aeruginosa* é necessário à adesão celular em hospedeiros mamíferos durante os estágios iniciais da infecção (HAHN, 1997) e também para a formação de biofilme (O'TOOLE & KOLTER, 1998). Uma mutação no gene *pilM* que codifica para *pilus* tipo IV de *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* reduziu a virulência, a formação de biofilme e motilidade dessa bactéria (BAHAR *et al.*, 2009).

O envolvimento de MreB na localização de *pili* sugere um papel dessa proteína na interação entre a bactéria e a célula hospedeira. Por exemplo, um mutante *mreB* de *Azospirillum brasilense* teve sua morfologia e superfície celular alterada (BIONDI *et al.*, 2004), indicando que a proteína MreB de *A. brasilense* pode estar envolvida com a interação com plantas. A estirpe SmR1 de *H. seropedicae* possui um agrupamento gênico que codifica o *pilus* tipo IV. Este grupo de genes está localizado uma região contendo também genes para o sistema de secreção do tipo III, o qual pode estar envolvido na interação com a planta (PEDROSA *et al.*, 2011). O achado que MreB é induzida pelo extrato de cana-de-açúcar suporta a hipótese de que ela pode estar envolvida na interação com a planta através do *pili* tipo IV.

A proteína flagelina FliC é o maior componente estrutural do filamento flagelar (TASTEYRE *et al.*, 2001), e teve sua expressão aumentada pelo extrato de cana-de-açúcar. Curiosamente, a regulação positiva de *fliC* (1,5 vez de aumento de expressão) (Tabela 4 e

Figura 8) foi observada quando *H. seropedicae* foi cultivado na presença de naringenina, um flavonóide derivado de plantas (TADRA-SFEIR, dados não publicados). O gene *fliC* de *Ralstonia solanacearum* também foi regulado positivamente durante a infecção do tomate (JACOBS et al., 2012). O flagelo bacteriano tem sido implicado na colonização das plantas por *Pseudomonas fluorescens*, uma bactéria promotora de crescimento de plantas (WEGER et al., 1987; CAPDEVILA et al., 2004), e pelo patógeno de alimentos *Listeria monocytogenes* (GORSKI et al., 2009). Flagelo também é importante na formação de biofilme pelos patógenos de plantas *Erwinia amylovora* (KOCZAN et al., 2011) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* (MALAMUD et al., 2011). Além disso, o desenvolvimento de nódulo de trevo doce foi atrasado pela mutação nos genes flagelares *fliP* e *flgH* de *Sinorhizobium meliloti* (FELIX et al., 1999). Curiosamente, em *Mesorhizobium loti* e Flg22, um peptídeo de 22 aminoácidos do domínio N-terminal da flagelina, induziu uma resposta de defesa similar em *Lotus japonicus*. As respostas de defesa induzidas por Flg22 causaram inibição na infecção e um retardamento na organogênese do nódulo (LOPEZ-GOMEZ et al., 2012). Juntos, esses resultados sugerem que uma fina regulação da síntese da flagelina e outros elicitores bacterianos é necessária para o estabelecimento de uma interação planta-bactéria bem sucedida.

A abordagem proteômica mostrou que o fator de alongação da tradução EF-TU de *H. seropedicae* não foi detectado quando as células cresceram na presença do extrato de cana-de-açúcar. A análise de RT-qPCR, contudo, indicou um decréscimo de somente 40% do mRNA de *tufB* (Figura 11), sugerindo que uma regulação pós-traducional pode também operar para controlar os níveis de EF-TU. Similarmente aos nossos resultados, várias isoformas de EF-TU de *G. diazotrophicus* tiveram sua expressão diminuída e uma isoforma de EF-TU foi completamente reprimida depois de sete dias de co-cultivo com plântulas de

cana-de-açúcar (dos SANTOS *et al.*, 2010). Por outro lado, o EF-TU de *Sinorhizobium meliloti* foi induzido em raízes noduladas de *Medicago truncatula*, indicando que essa proteína pode ser importante para a simbiose nas raízes das plantas (BESTEL-CORREL *et al.*, 2002). EF-TU teve sua expressão aumentada em *G. diazotrophicus* quando co-cultivada por 24 horas com cana-de-açúcar Chune e SP70-1143 (LERY *et al.*, 2008). Nossos resultados sugerem que o aumento de expressão de FliC e a diminuição de expressão de EF-TU em *H. seropedicae* cultivado na presença do extrato de cana-de-açúcar pode ser parte de uma coordenada regulação de fatores afetando a elicitação de sistemas de defesa para modular a resposta da planta temporariamente e permitir a colonização da planta.

6.5 Análise por PCR quantitativa da expressão gênica de *H. seropedicae* SmR1 na presença de 5% de extrato de cana-de-açúcar.

A figura 10 mostra o RNA total de *H. seropedicae* cultivado na presença e ausência do extrato de cana-de-açúcar em condições idênticas às aquelas descritas para a extração proteica. As bandas nítidas relativas ao rRNA 23S e 16S atestaram a qualidade do RNA total obtido.

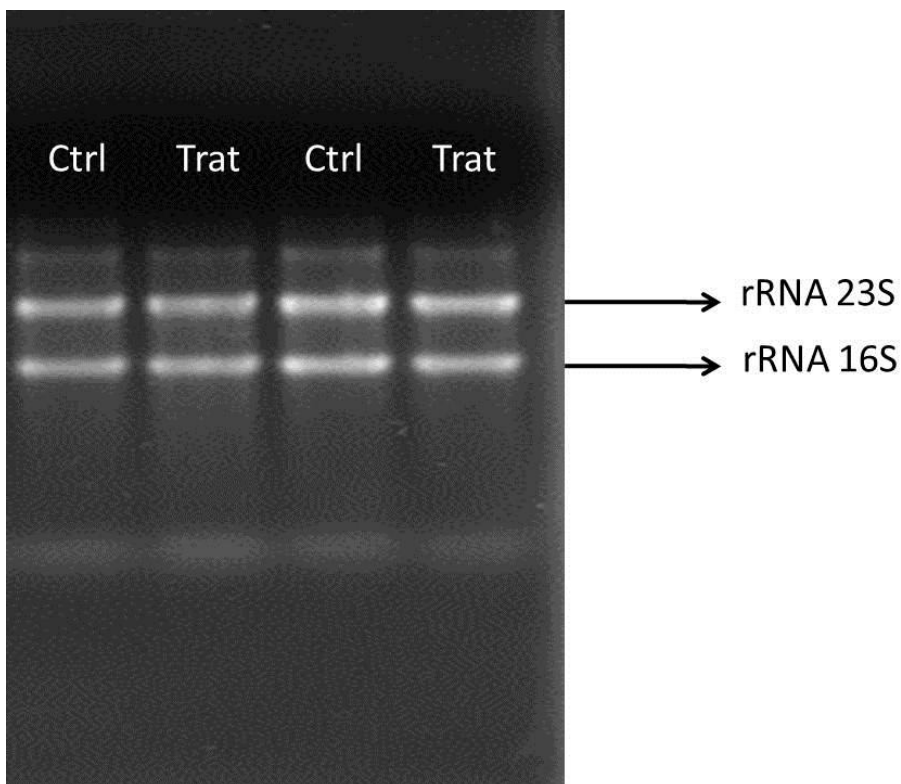


FIGURA 10 : GEL DE AGAROSE 1% DO RNA TOTAL DE *Herbaspirillum seropedicae* CULTIVADO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A expressão diferencial de todas as proteínas identificadas foi verificada por RT-qPCR (Figura 11). Variações na expressão gênica de um organismo ocorrem de acordo com suas necessidades fisiológicas e estão relacionadas com sua adaptação ao ambiente, diferenciação celular e condição de crescimento. A técnica de PCR em tempo real é o que existe de mais moderno na detecção dessas variações, pois permite que pequenas diferenças na expressão sejam evidenciadas possibilitando assim a quantificação precisa do nível de transcrição de genes específicos. A metodologia de quantificação relativa é baseada na expressão de um gene constitutivo (controle endógeno) e de uma condição controle que nesse caso é o mRNA da bactéria cultivada na ausência do extrato de cana-de-açúcar. O gene escolhido como controle endógeno tem função de normalizar a expressão gênica e é

um gene que possui expressão constitutiva. No caso deste trabalho os genes endógenos selecionados foram o *rpoC* e *rRNA* 16S. A condição controle pode ser uma amostra não tratada, indivíduos saudáveis ou uma amostra do ponto zero de análise. A quantificação foi relativa à expressão do gene alvo na condição controle e foi normalizada pela expressão dos genes do controle endógeno (PFAFFL, 2006).

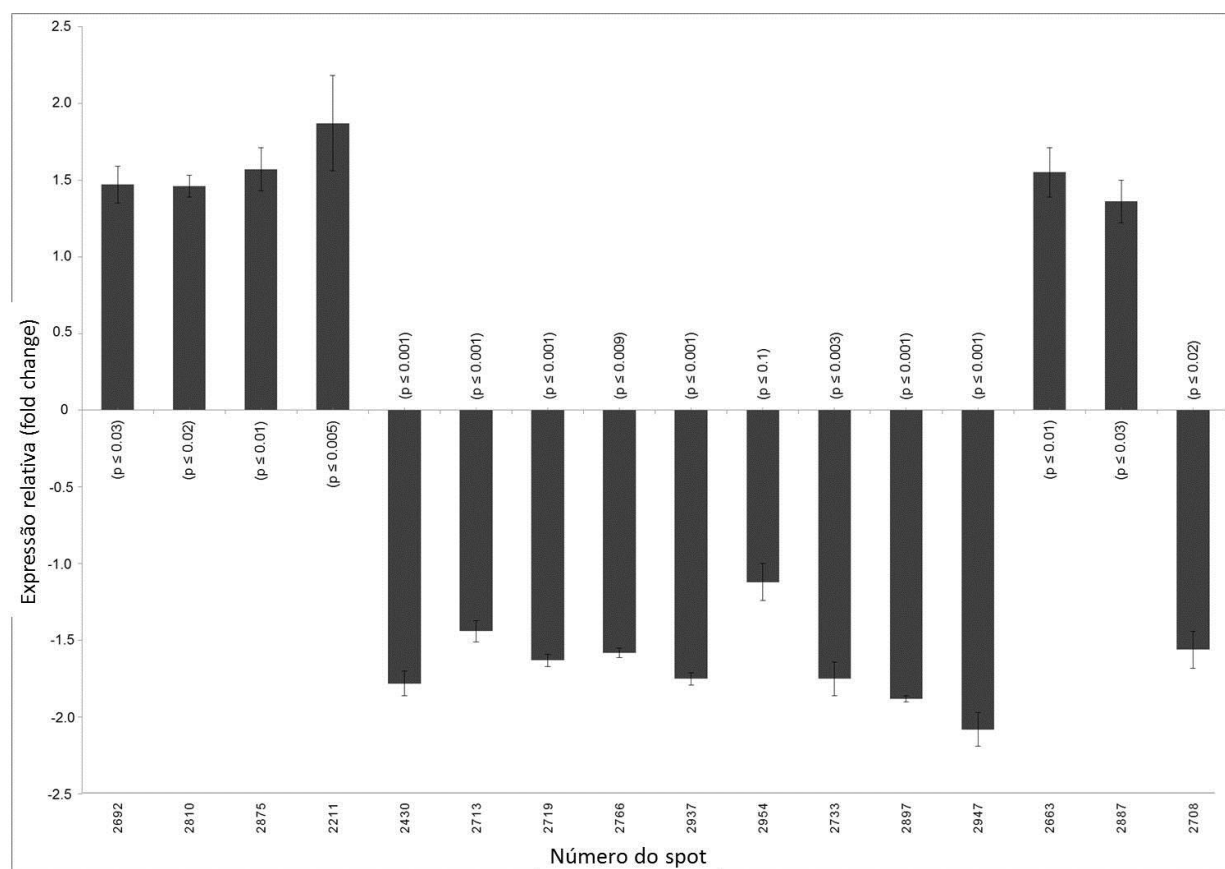


FIGURA 11: QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE mRNA POR RT-qPCR DOS GENES DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DE *H. seropedicae* EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO AO EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR. Os valores da expressão gênica de *H. seropedicae* cultivado na presença de extrato de cana-de-açúcar foram normalizados com a expressão dos genes constitutivos *16S rRNA* e *rpoC* e comparados a condição controle que foi o *H. seropedicae* cultivado sem extrato de cana. A expressão relativa foi determinada pelo método $2^{-\Delta \Delta C_t}$ (threshold cycle) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os resultados representam a média de três experimentos em replicata. O resultado do teste t de Student é mostrado para cada gene. Os experimentos de RT-qPCR foram executados usando Power SYBR green máster mix (Applied Biosystems), e as reações foram executadas em termociclador Step One Plus (Applied Biosystems).

A validação dos dados proteômicos pela técnica de qRT-PCR é importante para verificar se as mudanças no nível protéico são também observadas no nível transcricional.

Todos os genes avaliados no experimento de qRT-PCR tiveram sua expressão relativa condizente com o que se verificou nos dados proteômicos, indicando a eficácia da técnica em verificar se as diferenças de expressão obtidas na análise proteômica repetiriam-se quando se avalia os níveis de mRNA.

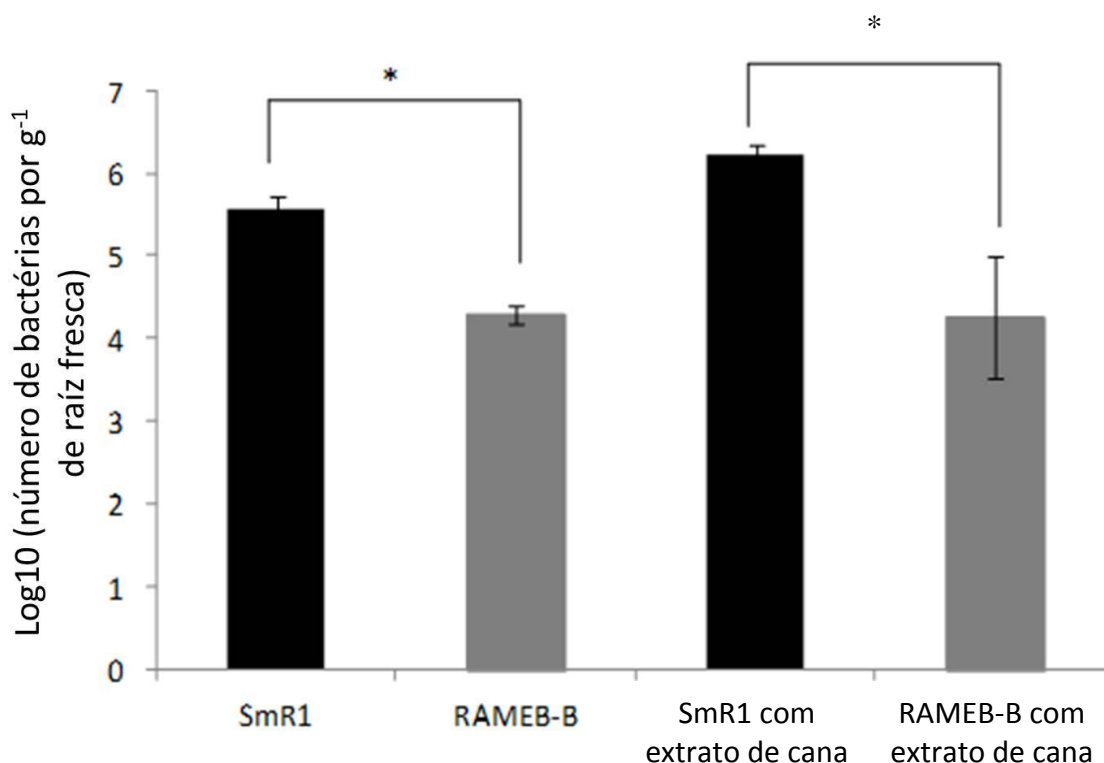


FIGURA 12: ENSAIO DE ADESÃO DA ESTIRPE SELVAGEM DE *H. seropedicae* SmR1 (barras pretas) E ESTIRPE MUTANTE *rfbB* RAMEB-B (barras cinzas) ÀS RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR B-4362. As estirpes bacterianas foram cultivadas na presença e ausência do extrato de cana-de-açúcar (5%) como conduzido nos demais experimentos. As células foram coletadas por centrifugação e lavadas com salina estéril (0,9% de NaCl). As raízes (aproximadamente 0,05 gramas de peso fresco) de cana-de-açúcar B-4362 esterilmente cultivadas foram inoculadas com 10^5 unidades formadoras de colônia das estirpes de *H. seropedicae* por 15 minutos, lavadas duas vezes por imersão em salina estéril, e então vortexadas vigorosamente por 30 segundos em 1mL de salina estéril. O sobrenadante foi usado para determinar o número de bactérias aderidas por grama de raiz fresca de cana-de-açúcar. Os resultados são mostrados como média Log10 (número de

bactérias por g⁻¹ de raízes frescas). A barra de erro indica o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas a um valor de P<0,05 (teste t).

6.6 Análise de expressão de genes responsivos à naringenina frente ao extrato de cana-de-açúcar

Tadra-Sfeir et al. 2011, obtiveram 5000 mutantes de *H. Seropedicae* com inserção randômica do transposon pTnMod-OgmKmlacZ que foram testados para a expressão diferencial de *lacZ* na presença de naringenina, um flavonóide vegetal com atividade antioxidante. Deste número de mutantes, 16 apresentaram expressão regulada por naringenina no ensaio com β -galactosidase, a saber: proteína de biossíntese de exopolissacarídeo (EPS) (expressão diminuída); provável O-antígeno acetilase (expressão diminuída); provável aciltransferase (expressão diminuída); provável muropeptídeo permease da superfamília de proteínas facilitadoras (AmpG) (expressão diminuída); provável acil-CoA: acetato/3cetoácido CoA transferase subunidade beta (expressão aumentada); provável tRNA (5-metilaminometil-2-tiouridilato) metiltransferase (expressão diminuída); provável sintase de 5- ácido aminolevulínico (expressão aumentada); provável NAD-dependente aldeído desidrogenase (expressão diminuída); provável indol piruvato ferredoxina oxidoreductase, subunidade alfa e beta(expressão diminuída); glucosiltransferase hipotética (expressão diminuída) e 6 genes codificando proteínas hipotéticas (4 com expressão diminuída e 2 aumentada). A tabela 7 mostra os resultados obtidos por Tadra *et al.*, (2011).

TABELA 7: IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *H. seropedicae* REGULADOS POR NARINGENINA

Cepa mutante	Produto gênico deduzido	qRT-PCR ^a
MHS01	Proteína de biossíntese de EPS (EpsG)	0,07 ± 0,045
MHS02	Provável O-antígeno acetilase	0,23 ± 0,11
MHS03	Proteína hipotética conservada	0,52 ± 0,082
MHS04	Provável aciltransferase	0,43 ± 0,047
MHS05	Provável muopeptídeo permease da superfamília de proteínas facilitadoras (AmpG)	0,12 ± 0,043
MHS06	Provável acil-CoA: acetato/3cetoácido CoA transferase subunidade beta	1,23 ± 0,012
MHS07	Provável tRNA (5-metilaminometil-2-tiouridilato) metiltransferase	0,24 ± 0,063
MHS08	Proteína hipotética	1,13 ± 0,09
MHS09	Provável sintase de 5- ácido aminolevulínico	0,93 ± 0,046
MHS10	Proteína hipotética	0,71 ± 0,01
MHS11	Proteína conservada hipotética	0,81 ± 0,056
MHS12	Provável NAD-dependente aldeído desidrogenase	0,258 ± 0,075
MHS13	Proteína hipotética	0,21 ± 0,038
MHS14	Provável indol piruvato ferredoxina oxidoreductase	0,15 ± 0,015
MHS15	Glucosiltransferase hipotética	0,23 ± 0,04
MHS16	Proteína hipotética conservada	0,17 ± 0,053

A expressão relativa foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (método ciclo *threshold*). Os resultados representam a média de três replicatas. Os experimentos de qRT-PCR foram feitos usando Power SYBR green master mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) e as reações foram feitas no aparelho Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems).

Uma vez que flavonóides presentes no extrato de cana-de-açúcar poderiam ser possíveis moléculas sinalizadoras, a expressão dos genes identificados por Tadra-Sfeir *et al.* (2011) foi estudada na bactéria cultivada na presença de extrato de cana-de-açúcar por qRT-PCR. O mRNA de células de *H. seropedicae* cultivado na presença e ausência do extrato de cana-de-açúcar (até uma absorbância de 0,6 em 600 nm) foi purificado e utilizado como molde para produção de cDNA como descrito em Materiais e Métodos. Os genes que foram regulados são mostrados na figura 13.

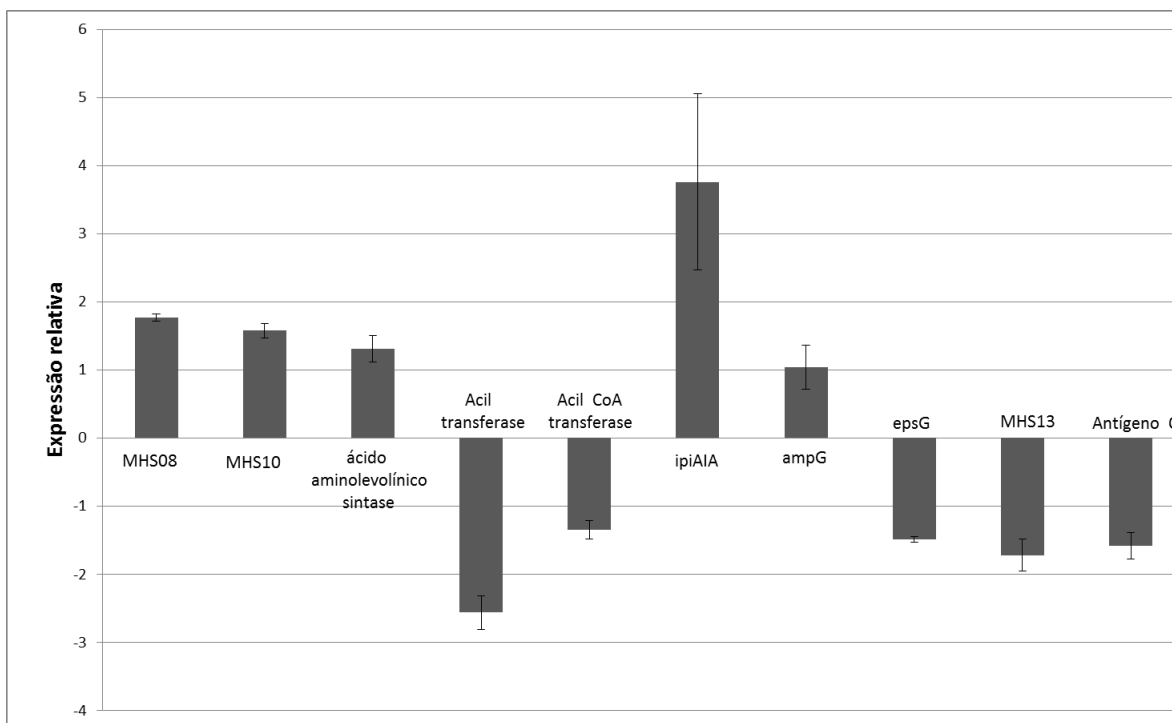


FIGURA 13: EFEITO DO EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA EXPRESSÃO DE GENES DE *H. seropedicae* REGULADOS POR NARINGENINA. Expressão relativa de genes regulados por naringenina de *H. seropedicae* e cultivados na presença e ausência de extrato de cana-de-açúcar.

De todos os 16 genes detectados no estudo de Tadra-Sfeir et al. (2011) e que tiveram sua expressão testada usando o extrato de cana-de-açúcar no meio de cultivo de *H. seropedicae*, seis deles tiveram padrões de expressão parecida com os dados obtidos por Tadra et al. (2011) que foram: provável O-antígeno acetilase (expressão diminuída); proteína de biossíntese de exopolissacarídeo (EPS) (expressão diminuída); proteína hipotética MHS08 (expressão aumentada); provável sintase de 5- ácido aminolevulínico (expressão aumentada); provável aciltransferase (expressão diminuída); e a proteína hipotética MHS13 (expressão diminuída).

No estudo de Tadra-Sfeir et al., (2011), o gene *ipiAIA* que codifica a proteína indol piruvato ferredoxina oxidoredutase teve sua expressão diminuída na presença de

naringenina, mas quando esse gene esteve em contato com o extrato de cana-de-açúcar a sua expressão foi significativamente aumentada. A indol piruvato ferredoxina oxidorreductase pode estar envolvida na síntese do hormônio ácido indol acético (IAA), que é um hormônio de crescimento vegetal e produzido por plantas e bactérias (TADRA-SFEIR *et al.*, 2011). A interação entre plantas e bactérias produtoras de IAA leva a diversos resultados para a planta, variando da patogênese à fitoestimulação. Revisando o papel de IAA bacteriano em diferentes interações entre plantas e bactérias, vem à tona o fato que a bactéria usa esse fitormônio para interagir com plantas como parte da sua estratégia de colonização, incluindo a fitoestimulação e a superação dos mecanismos de defesa basais da planta (revisado por SPAEPEN *et al.*, 2007). Na bactéria simbiótica *Rhizobium sp.* estirpe NGR234, os flavonóides produzidos pela planta hospedeira, e que se acumulam na rizosfera, estimulam a produção de IAA (PRINSEN *et al.*, 1991). Em *Xanthomonas axonopodis* a produção de IAA foi aumentada na presença de extratos de folha de laranja - *Citrus sinensis* (COSTACURTA *et al.*, 1998). O triptofano foi reportado como o principal precursor para a biossíntese de IAA em bactérias (THEUNIUS *et al.*, 2004). A aplicação de triptofano exógeno implicou em forte aumento da produção de IAA em várias bactérias: *Azospirillum brasilense* (PRINSEN *et al.*, 1993), *Pantoea agglomerans* (BRANDL & LINDOW, 1996), *Pseudomonas putida* (PATTEN & GLICK, 2002) e *Rhizobium* (THEUNIS *et al.*, 2004).

Já que a presença de triptofano foi detectada no extrato de cana-de-açúcar (PARISH, 1965) é compreensível o aumento de expressão do gene *ipiAIA*, sendo seu produto a indol piruvato ferredoxina oxidorreductase uma proteína que pode ter importante papel na interação entre *H. seropedicae* e cana-de-açúcar.

Os níveis de expressão de antígeno-O acetilase também diminuíram quando *H. seropedicae* foi cultivado na presença de extrato de cana, resultado semelhante quando a bactéria foi exposta à naringenina. O antígeno – O é a parte mais externa do LPS da bactéria e é altamente variável entre bactérias gram-negativas. O antígeno-O é geralmente constituído de unidades oligossacarídicas repetitivas. Essas cadeias polissacarídicas formadas de composição e estrutura espacial extremamente variáveis, projetam-se a partir da membrana externa da bactéria para o meio, constituindo a superfície molecular que realiza o primeiro contato com um possível hospedeiro. Devido a esta característica, os LPS exercem uma importante função nos processos de reconhecimento e comunicação celular (KANNENBERG *et al.*, 1998). Em *Salmonella typhimurium*, o antígeno-O é acetilado pela antígeno-O acetilase conferindo mudanças de sorotipo em que há alterações na estrutura do antígeno-O criando ou destruindo uma série de epítomos conformacionais (SLAUCH *et al.*, 1996). Por algum motivo relacionado à interação com a planta, essa enzima teve sua expressão reduzida em contato com a cana-de-açúcar como com a naringenina.

Outro resultado similar com o de Tadra-Sfeir *et al.*, (2010) foi a diminuição da expressão relativa do gene *epsG* que é envolvido na síntese de exopolissacarídeos (EPS). EPS é responsável pelos processos de adesão em substratos e são cruciais na manutenção integral da estrutura de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (CHEN & STEWART, 2002). Assim como a naringenina, o extrato de cana foi capaz de reduzir a expressão de genes relacionados tanto com LPS como com EPS.

A expressão relativa da acil-CoA transferase na presença de extrato de cana-de-açúcar 5% foi oposta à expressão na presença de naringenina. Este resultado pode indicar que além de flavonóide, outros compostos que estão presente no extrato podem alterar a expressão deste gene.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato de cana-de-açúcar altera o proteoma de *H. seropedicae* SmR1 e a maioria das proteínas diferencialmente expressas são envolvidas em vias metabólicas, indicando que mudanças metabólicas acontecem em respostas às moléculas sinais e nutrientes. Embora o exsudato de planta ao qual a bactéria é exposta sob condições naturais não tenha a mesma composição do extrato usado nesse trabalho, é provável que eles compartilhem um número considerável de componentes, sugerindo que vias similares são reguladas quando a bactéria está em contato com a planta. Os resultados mostraram que as vias biossintéticas tais como a biossíntese de purinas e aminoácidos são reguladas negativamente, provavelmente devido à disponibilidade desses nutrientes no extrato de cana-de-açúcar. Mais importante, as proteínas RpsA, MreB, GlmU, FliC e EF-TU foram diferencialmente expressas e podem ser envolvidas na interação entre *H. seropedicae* e plantas. GlmU, MreB e FliC são envolvidas na modificação de parede celular indicando que há mudanças no envelope celular quando a bactéria está em contato com moléculas derivadas das plantas. GlmU catalisa a síntese de UDP-GlcNAc, um precursor de LPS e peptidoglicano que juntamente com as proteínas EF-TU e FliC são conhecidos como MAMPS, estimulando o sistema imune inato da planta. Esse resultado sugere que *H. seropedicae* modula a resposta do sistema imune da planta. Em consonância com essa hipótese, foi mostrado que os genes relacionados com a defesa codificando para tioninas e PBZ1 de raízes de arroz foram reprimidos sob a inoculação de *H. seropedicae* (BRUSAMARELLO-SANTOS *et al.*, 2011). O flagelo e LPS podem também estar envolvidos na adesão bacteriana às superfícies das raízes, assim as mudanças observadas podem sugerir que *H. seropedicae* modifica a parede celular na preparação para interação com a superfície da raiz.

7 - CONCLUSÕES

1- Trinta proteínas foram diferencialmente expressas por *H. seropedicae* na presença de extrato de cana-de-açúcar.

2- A espectrometria de massa de MALDI-TOF permitiu a identificação de 16 proteínas com expressão regulada por extrato de cana-de-açúcar, que pode ser divididas em 2 grandes classes: proteínas relacionadas com vias metabólicas e proteínas provavelmente envolvidas na interação planta-bactéria.

Essas alterações verificadas, tanto no nível proteômico como no nível transcricional, evidenciam que a adaptação ao hospedeiro leva a uma considerável mudança metabólica como resultado da disponibilidade de uma nova gama de nutrientes no extrato de cana-de-açúcar.

Quatro proteínas diferencialmente expressas podem estar relacionadas na interação de *H. seropedicae* com a planta da cana-de-açúcar: RpsA 30s subunidade ribossomal S1; MreB actina ATPase envolvida na morfogênese celular; FliC flagelina filamento estrutural; e TufB EF-TU fator de elongação. É possível concluir que a interação benéfica inicia-se com mecanismo comum de infecção, pois as proteínas EF-TU e FliC são MAMPS (*microbe associated molecular patterns*).

3- A técnica de qRT-PCR foi efetiva no acompanhamento dos níveis de mRNA para efeito comparativo com os dados proteômicos. A expressão diferencial das proteínas foi também verificada no nível do mRNA com níveis aproximados de expressão.

4- Genes de *H. seropedicae* responsivos ao flavonóide naringenina foram testados para a responsividade ao extrato de cana-de-açúcar mostrando que o extrato que foi capaz de alterar a expressão de alguns importantes genes responsivos à naringenina. Esses resultados podem ser elucidativos acerca da interação planta-bactéria.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. Plant Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to promote plant growth. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008

ANDA – Investimentos no Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.anda.org.br/multimidia/investimentos.pdf> Acessado 01/10/2013

ANSONG, C.; PURVINE, S. O.; ADKINS, J.N. et al. Proteogenomics: needs and roles to be filled by proteomics in genome annotation. **Brief. Funct. Gen. Proteom.** v. 7, p. 50-62, 2008.

ARSHAD, M.; SALEEM, M.; HUSSAIN, S. Trends in Biotechnology Jun 15; [Epub ahead of print] PMID: 17573137, 2007.

BAHAR, O.; GOFFER, T. et al. Type IV Pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. Citrulli. **Mol. Plant Microbe Interact.** v. 22, p. 909-920, 2009.

BAIROCH, A.; APWEILER, R. et al. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Res.** v. 33 Database Issue: D154-159, 2005.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J.. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum spp.* in Brazil. **Biol. Fertil. Soils**, v. 4, p.37-40, 1987.

BALDANI J.I.; BALDANI V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Sys Bacteriol.** v. 36, p. 86–93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65–73, 1992.

BALDANI J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSÉN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.** V. 46, p. 802–810, 1996.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia sp.* **Biol. Fertil. Soils**, v. 30, p. 485–491, 2000.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane — reasons for success in Brazil. **Funct. Plant Biol.** v. 29, p. 417-423, 2002.

BALSANELLI, E.; SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. et al. *Herbaspirillum seropedicae* *rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environ. Microbiol.** v. 12, p. 2233-2244, 2010.

BARRETEAU, H.; KOVAČ, A.; BONIFACE, A.; SOVA, M.; GOBEC, S.; BLANOT, D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 32, p. 168–207, 2008.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN L. E. Bacteria/plant growth-promotion. In: Hillel D, editor. Encyclopedia of soils in the environment. Oxford, UK: Elsevier. v. 1, p 103–115, 2005.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regul.** v. 24, p. 7–11, 1998.

BESTEL-CORREI, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; POINSOT, V.; DIEU, M.; DIERICK, J. F.; TUINEN, D.; REMACLE, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 23, p. 122–137, 2002.

BENAN, D.; CUNIN, R.; AKCEA, H. Expression and functional analysis of glutamate synthase small subunit-like proteins from archaeon *Pyrococcus horikoshii*. **Microbiol. Res.** v. 166, p. 294-303, 2011.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONÇALVES, A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. **Mol. Cell. Proteom.** v. 5, p. 1772-1786, 2006.

BIONDI, E. G.; ALTIERI, M. F.; BONZI, L. F.; BAZZICALUPO, M.; DEL GALLO M. Extended phenotype of an *mreB*-like mutant in *Azospirillum brasilense*. **Microbiology**, v. 150, p. 2465 – 2474, 2004.

BODDEY, R. Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production. **Crit. Rev. Plant Sci.** v. 14, p. 263 – 279, 1995.

BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 23 Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 7 Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo. Caxambu Resumos UFLA/SBCS/SBM, p. 809, 1998.

BODDEY, R.M., da SILVA, G., REIS, V.M., ALVES, B.J.R.A., URQUIAGA, S. Assessment of bacterial nitrogen fixation in grass species. In 'Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process'. (Ed. E Triplet) p. 705–726. (**Horizon Scientific Press: Wymondham, UK**), 2000.

BOECKMANN, B.; BAIROCH, A.; APWEILER, R.; BLATTER, M.C.; ESTREICHER, A.; GASTEIGER, E.; MARTIN, M.J.; MICHOD, K.; O'DONOVAN, C.; PHAN, I. et al. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. **Nucleic Acids Res.** v. 31, p. 365-370, 2003.

BUDDE, C.F.; MAHAN, A.E.; LU, J.; RHA, C.; SINSKEY, A.J. Roles of Multiple Acetoacetyl Coenzyme A Reductases in Polyhydroxybutyrate Biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. **J. Bacteriol.** v.192, p. 5319–5328, 2010.

BUENDIA-CLAVERIA, A. M.; MOUSSAID, A.; OLLERO, F. J. et al. A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. **Microbiol.** v. 149, p. 1807–1818, 2003.

BURRIS, R.H.; Nitrogenases. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 9339-9342, 1991.

BRANDL, M.T.; LINDOW, S.E. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, p. 4121–4128, 1996.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; PACHECO, F. et al. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, DOI 10.1007/s11104-011-1044-z, 2011.

CANUTO, E. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Braz. J. Microbiol.** v. 34, P. 62-64, 2003.

CAPDEVILA, S.; GRANERO, F. M. M.; CONTRERAS, M. S.; RIVILLA, R.; MARTÍN, M. Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. **Microbiol.** v. 150, p. 3889–3897, 2004.

CASTILLO, A.; TABOADA, H.; MENDOZA, A.; VALDERRAMA, B.; ENCARNACIÓN, S.; MORA, J. Role of GOGAT in carbon and nitrogen partitioning in *Rhizobium etli*. **Microbiol.** v. 146, p. 1627–1637, 2000.

CHAVES, D.F.; FERRER, P.P. et al. A two-dimensional proteome reference map of *Herbaspirillum seropedicae* proteins. **Proteomics**, v. 7, 3759-3763, **2007**.

CHATTERJEE, S.; SONTI, R.V. Virulence deficiency caused by a transposon insertion in the *purH* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Can. J. Microbiol.** v. 51, p. 575, 2005.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, E. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C. et al. Sugarcane (*saccharum x officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biol.** v. 4, 62-89, 2011.

CHEN, X.; STEWART, P.S. Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 59(6), p.718-20, 2002.

CHENG, Z.; MCCONKEY, B.J.; GLICK, B.R. Proteomic studies of plant-bacterial interactions. **Soil Biology & Biochem.** v. 42, p. 1673-1684, 2010.

CHENG, Z.; DUAN, J.; HAO, Y.; MCCONKEY, B.J.; GLICK, B.R. Identification of bacterial proteins mediating the interactions between *Pseudomonas putida* UW4 and Brassica napus (Canola). **Mol. Plant Microbe Interact.** v. 22, p. 686-694, 2009.

CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E. M. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v. 356, p. 197–207, 2012

COAKER, G.L.; WILLARD, B.; KINTER, M.; STOCKINGER, E.J.; FRANCIS, D.M. Proteomic analysis of resistance mediated by Rcm 2.0 and Rcm 5.1, two loci controlling resistance to bacterial canker of tomato. **Mol. Plant Microbe Interact.** v.17, p. 1019-1028, 2004.

COLOMBO, R.; LANCAS, F. M.; YARIWAKE, J.H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. **J. Chromat.** v. 1103, p. 118–124, 2006.

COPERSUCAR (2008) Academia do açúcar e do álcool. http://www.copersucar.com.br/institucional/por/academia/cana_acucar.asp.

CORDEIRO, F.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; HUERGO, L.F. *et al.*, Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* cultivated in the presence of sugar cane extract. **J. Proteome Res.** v. 12, p. 1142-1150, 2013.

COSTACURTA, A.; MAZZAFERA, P.; ROSATO, Y.B. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is increased in the presence of plant leaf extracts. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 159, p. 215–220, 1998.

COX, R.J. The DAP pathway to lysine as a target for antimicrobial agents. **Nat. Prod. Rep.** p. 29-43, 1996.

COWLES, K.N.; GITAI, Z. Surface association and the MreB cytoskeleton regulate pilus production, localization and function in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.** v. 76 p. 1411-1426, 2010.

DIVAKARUNI, A. V.; BAIDA, C. et al. The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. **Mol. Microbiol.** v. 66, p. 174-188, 2007.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.** v. 22, p.107–149, 2003.

DÖBEREINER, J.; PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; URQUIAGA, S. Bactérias diazotróficas podem ser endofíticas ou fitopatogênicas? **An. Acad. Bras. Cienc.** v.62, p. 319, 1990.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F.; REIS, V. M. Endophytic diazotrophs: The key to BNF in gramineous plants. *In* Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Eds. N A Hegazi, M Fayez and M Monib. pp 395-408. Am. Univ. in Cairo Press, 1994 Cairo, Egypt.

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Bid. Biochem.** v. 29, p. 771-774, 1997.

DOS SANTOS, M.F.; MUNIZ DE PADUA, V.L. et al. Proteome of Gluconacetobacter diazotrophicus co-cultivated with sugarcane plantlets. **J. Proteomics**, v. 73, p. 917-931, 2010.

DRØBAK, B.K. The plant phosphoinositide system. **Biochem J.** v. 288, p. 697–712, 1992.

DYE, N.A.; PINCUS, Z.; et al. Two independent spiral structures control cell shape in Caulobacter. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, p. 18608-18613, 2005.

EBERHARDT, M.V.; LEE, C.Y.; LIU, R.H. Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, v. 405, p. 903, 2000.

EMBRAPA - CANA-DE-ACUCAR: UMA ALTERNATIVA DE ALIMENTO PARA A SECA <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/cot/COT73.html>> Acesso em 28/03/2013.

ENG, J.K.; MCCORMACK, A.L.; YATES 3RD, J.R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** v. 5, p. 976-989, 1994.

ERBS, G.; NEWMAN, M. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. **Mol. Plant Pathol.** v. 13, p. 95-104, 2012.

FELIX, G.; DURAN, J. D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **The Plant Journal**, v. 18, p. 265–276, 1999.

FERGUSON, A. R. B., Sugarcane and Energy: Optimum Population Trust., 9, p.1999 2004,

Food and Agriculture Organization of the United Nations em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> acesso em 26/03/2013

FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.** v. 171, p. 3168-3175, 1989.

GAREL, M.C.; LEMARCHANDEL, V.; PREHU, M.O.; CALVIN, M. C.; AROUS, N. et al. Natural and artificial mutants of the human 2,3-bisphosphoglycerate as a tool for the evaluation of structure function relationships. **Biomed. Biochim. Acta**, v. 49, p. 166-71, 1990.

GAUT, B. S. Evolutionary dynamics of grass genomes. Tansley review 132. **New Phytol.**, v. 154, p. 15- 28, 2002.

GITAI, Z.; DYE, N. A. et al. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. **Cell**, v. 120, p. 329-341, 2005.

GLICK, B.R.; JACOBSON, C.B.; SCHWARZE, M.; M.KPASTERNAK, J.J. 1-Aminocyclopropane-1- carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. **Can. J. Microbiol.** , v. 40, p. 911–915, 1994.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free living bacteria **Can. J. Microbiol.** v. 41, p.109-117, 1995.

GLICK, B.R.; PATTEN, C.L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D.M. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria, Imperial College Press, London, (1999).

GLICK, B. R.; CHENG, Z.; CZARNY, J; DUAN, J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **Eur J. Plant Pathology**, v. 119, p. 329-339, 2007.

GORG, A. Two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. Technische Universitat Munchen, A Laboratory Manual, 166 p. 2007

GORSKI, L.; DUHE, J. M.; FLAHERTY, D. The Use of Flagella and Motility for Plant Colonization and Fitness by Different Strains of the Foodborne Pathogen *Listeria monocytogenes*. **PlosOne**, v. 4, e5142, 2009.

GOTS, J. S.; BENSEN, C. E.; JOCHIMSEN, B.; KODURII, K. R. **CIBA Found. Symp.**, 48, 23-41 1977.

GOSS, T.; PEREZ-MATOS, A.; BENDER, R. A. Roles of glutamate synthase, *gltBD*, and *gltF* in nitrogen metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. **J. Bacteriol.** v. 183, p. 6607-6619, 2001.

GOUGH, C.; GALERA, C.; et al. Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v.10, p. 560-570. 1997.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; REDDY, P.M.; LADHA, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytol.** v.154, p.131–145, 2002.

GYGI, S.P.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and proteomics. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 4, p. 489-494, 2000.

HAHN, H.P. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* - A review. **Gene**, v. 192, p. 99-108, 1997.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** v.43, p.895–914,1997.

HONDERMARCK, H.; TASTET, C.; YAZIDI-BELKOURA, I. E.; TOILLON, R. A.; BOURHIS, X. L. Proteomics of breast cancer: The quest for markers and therapeutic targets. **J. Prot. Res.**, v. 7, n. 4, p. 1403-1411, 2008.

JACOBS, J. M.; BABUJEE, L.; MENG, F. et al. The *In Planta* Transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: Conserved Physiological and Virulence Strategies during Bacterial Wilt of Tomato. **mBio**, v.3, e00114-12, 2012.

JAFFE, J. D., BERG, H. C., CHURCH, G. M. Proteogenomic mapping as a complementary method to perform genome annotation. **Proteomics**, v. 4, p.59-77, 2004

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.** v. 17, p.77–119, 1998.

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth promotion bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 15, p. 894–906, 2002.

JONES, A.M.; THOMAS, V.; TRUMAN, B.; LILLEY, K.; MANSFIELD, J.; GRANT, M. Specific changes in the *Arabidopsis* proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1805-1816, 2004.

JORRÍN-NOVOA, J.V.; MALDONADOA, A.M.; et. al. Plant proteomics update (2007e2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **J. Prot.** v. 72, 285e314, 2009.

JENKINS, A.; COTE, C. et al. Role of purine biosynthesis in *Bacillus anthracis* pathogenesis and virulence. **Infect. Immun.** v. 79, p. 153-166, 2011.

KAMEKURA, M. Diversity of extremely halophilic bacteria. **Extremophiles**, v. 2, p. 289-295, 1998.

KANNENBERG, E.L.; REUHS, B.L.; FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structure, biosynthesis and functions. In: The Rhizobiacea. Ed. H.P. SPAINK; A. KONDOROSI; P.J.J. HOOYKAAS. Dordrecht:Kluwer Academic Publisher, pp. 154, 1998.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, 2299e2301, 1988.

KIM, J.; REES, D.C., Nitrogenase and biological nitrogen fixation., **Biochemistry**, v. 33, p. 389-397, 1994.

KIM, Y.R.; LEE, S.E. et al. Characterization and Pathogenic Significance of *Vibrio vulnificus* Antigens Preferentially Expressed in Septicemic Patients. **Infect. Immun.** v. 71, p. 5461-5471, 2003.

KLEE, H.J.; HAYFORD, M.B.; KRETZMER, K.A.; BARRY, G.F.; KISHORE, G.M. **Plant Cell**, v. 3, p. 1187–1193, 1991.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.

KOCZAN, J. M.; LENNEMAN, B. R.; MCGRATH, M. J.; SUNDIN, G. W. Cell Surface Attachment Structures Contribute to Biofilm Formation and Xylem Colonization by *Erwinia amylovora*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.77, p. 7031–7039, 2011.

KOMAROVA, A.V.; TCHUFISTOVA, L.S.; SUPINA, E.V.; BONI, I.V. Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine–Dalgarno sequence on translation. **RNA**, v. 8, p. 1137–1147, 2002.

KRUSE, T.; BORK-JENSEN, J. et al. The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. **Mol. Microbiol.** v. 55, p.78-89, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970

LEAVER, M.; ERRINGTON, J. Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.** v. 57, p. 1196–1209, 2005.

LERY, L. M.; VON KRUGER, W.M. et al. A comparative proteomic analysis of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 at exponential and stationary phases of cultures in the presence of high and low levels of inorganic nitrogen compound. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1784, p.1578-1589. 2008.

LI, R.; MACRAE, I.C.; Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biol. Biochem.** v. 24, p. 413–419, 1992.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method. Methods**, v.25, p. 402-408, 2001.

LOPEZ-GOMEZ, M.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; BOLLER, T. Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. **J. Experiment. Botany**, v. 63, p. 393–401, 2012.

MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A. et al. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development Microbiology, v. 157, p. 819–829, 2011.

MALAVOLTA, E. Nutrient and fertiliser management in sugarcane. IPI-Bulletin 14, 1994.

MANN, M., HENDRICKSON, R. C., PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Rev. Biochem.** v. 70, p. 437-473, 2001.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R., Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms. **Biochemical Society Transactions**, v.33, p. 11, 2005.

MATSUOKA, S. ; GARCIA, A. A. F. ; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: Borém A (ed) Melhoramento de espécies cultivadas. Editora UFV, Viçosa, p. 205–251, 1999.

MAURIELLO, E.M.; MOUHAMAR, F.; DUCRET, N.B.; DAI, D. et al. Bacterial motility complexes require the actin-like protein, MreB and the Ras homologue, MglA. **EMBO J.**, v. 29, p. 315–326, 2010.

MCFARLAND, W.C.; STOCKER, B.A.D. Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of *Salmonella dublin* and of two strains of *Salmonella typhimurium*. **Microb. Pathogenesis**, v. 3, p. 129-141, 1987.

Ministério da Agricultura: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar> (Acesso em 03/04/2013)

MELO, A.M.; BANDEIRAS, T.M. et al. New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 603-616, 2004.

MIO, T.; YABE, T. et al. The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases - Gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 14392-14397, 1998.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEN, R.; MARIN, A. M. et al., *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**, v. 356, p. 175-196, 2012.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Diazotrophic associations in sugarcane cultivation in South India. **Tropical Agriculture** v. 76, p. 171-178, 1999.

NAS, Frontiers in Agricultural Research: Food, Health, Environment, and Communities: National Academy of Sciences, Washington, DC, 239 pp, 2003http://dels.nas.edu/rpt_briefs/frontiers_in_ag_final%20for%20print.pdf (acesso em 03/04/2013).

NATERA, S.H.; GUERREIRO, N.; DJORDJEVIC, M.A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 13, p. 995-1009, 2000.

NEUHOFF, V., STAMM, R., EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. **Electrophoresis**, 1985.

NEWMAN, J. D.; DIEBOLD, R. J.; SCHULTZ, B. W.; NOEL, K. D. Infection of soybean and pea nodules by *Rhizobium* spp. purine auxotrophs in the presence of 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. **J. Bacteriol.** v. 176, p. 3286-3294, 1994.

NOEL, K. D.; DIEBOLD, R. J.; CAVA, J. R.; BRINK, B. A. Rhizobial purine and pyrimidine auxotrophs: nutrient supplementation, genetic analysis, and the symbiotic requirement for *de novo* purine biosynthesis. **Arch. Microbiol.** v. 149, 499-506, 1988.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OKAZAKI, S.; HATTORI, Y.; SAEKI, K. The *Mesorhizobium loti purB* Gene Is Involved in Infection Thread Formation and Nodule Development in *Lotus japonicus*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 8347-8352, 2007.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205–215, 2002.

OLIVEIRA, N. Análise comparativa do proteoma do tecido mamário de pacientes com carcinoma lobular e ductal. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas – UFPR, Curitiba, p. 35, 2011.

OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Burning cane: the long term effects. **Int. Sugar J.** v. 96, p. 272-275, 1994.

OMETTO, A. R.; MANGABEIRA, J. A. C.; HOTT, M. C. Mapeamento de potenciais de impactos ambientais da queima de cana-de-açúcar no Brasil; Anais do XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil.

<http://martedpi.inpe.br/col/ltid.inpe.br/sbsr/2004/11.19.16.07/doc/2297.pdf>. Acesso 14 Jul. 2013

OREN, A. The ecology of the extremely halophilic archaea. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 13, p. 415–440, 1994.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol. Microbiol.** v. 30, p. 295-304, 1998.

PARISH, D. H. The amino-acids of cane-juice and the effect of nitrogenous fertilisation on the levels of these substances. **J. of Sci. of Food and Agriculture**, v. 16, p. 240-242, 1965.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, p. 3795–3801, 2002.

PATZEK, T. W., AND PIMENTEL, D. Thermodynamics of energy production from Biomass. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 24, p. 327–364, 2005.

PFAFFL, M.W., Relative Quantification In: DORAK, T.M., **Real-Time PCR**, New York, International University Line, p. 63-82, 2006.

PIMENTEL, D.; PATZEK, T. Ethanol Production: Energy and Economic Issues Related to U.S. and Brazilian Sugarcane. **Nat. Resour. Res.**, v. 16, 2007.

PEDROSA, F.O.; MONTEIRO R.A. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genet.** v. 7 e1002064, 2011.

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.; CREASY, D.M.; COTTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3551-3567, 1999.

POLISSI, A.; PONTIGGIA, A.; FEGER, G.; ALTIERI, M.; MOTTL, H.; FERRARI, L.; SIMON, D. Large-Scale Identification of Virulence Genes from *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.** p. 5620–5629, 1998.

PRINSEN, E.; CHAUVAUX, N.; SCHMIDT, J.; JOHN, M.; WIENEKE, U.; DEGREEF, J.; SCHELL, J.; VANONCKELEN, H. Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. **FEBS Lett.** v. 282, p. 53–55, 1991.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN ONCKELEN, H. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Mol. Plant–Microbe Interact.** v. 6, p. 609–615, 1993.

PURSEGLOVE, J.W. Tropical crops: monocotyledons. Longman Group Ltd., London. 607 pp. 1979.

QUIRINO, B.F.; CANDIDO, E.S.; CAMPOS, P.F.; FRANCO, O.L.; KRÜGER R.H. Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions **Phytochemistry**, v.71, 351–362, 2010.

RABILLOUD T, et al, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future, **J. Prot.** (2010), doi:10.1016/j.jprot.2010.05.016

RAPALA-KOZIK, M.; OLCZAK, M.; OSTROWSKA, K.; STAROSTA, A.; KOZIK, A. Molecular characterization of the *thi3* gene involved in thiamine biosynthesis in *Zea mays*: cDNA sequence and enzymatic and structural properties of the recombinant bifunctional protein with 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (phosphate) kinase and thiamine monophosphate synthase activities. *Biochemistry Journal*, v. 408, p. 149-159. 2007.

REDDY, C.S.K GHAI, R.; RASHMI, G.; KALIA, V.C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Biores. Technol.** v. 87, p. 137–146, 2003.

REIS JR, F.B.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v. 219, p. 153–159, 2000.

REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 57, p. 155-176, 2003.

RENWICK, C.J.; DOBSON, S.R.A.; DEVENISH, A.; TURNER, L.A.; CLIFFORD, V.R.F.; PEARCE, G.; JAMESON, G.B.; GERRARD, J. A. Role of Arginine 138 in the Catalysis and Regulation of *Escherichia coli* Dihydrodipicolinate Synthase. **Biochemistry**, v. 44, p. 13007–13013, 2005.

ROCHA, F.R.; PAPINI-TERZI, F.S.; NISHIYAMA, M.Y.; et al. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics** v. 71, p. 2164–2168, 2007.

RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; et al. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedlings. **Symbiosis**, v. 35, p. 01–10, 2003.

ROSALES-REYES, R.; SALDIAS, M.S.; AUBERT, D.F.; et al. The *suB* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for protein secretion, biofilm formation, motility and polymyxin B resistance. **Microbiol.** v.158, p. 2315-2324, 2012.

ROTHBALLER, M.; ECKERT, B.; SCHMID, M.; FEKETE, A.; SCHLOTTER, M.; LEHNER, A.; POLLMANN, S.; HARTMANN, A. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. **FEMS Microbiol Ecol.** v.66, p.85–95, 2008.

RHODES, M.J.C.; PRICE, K.R. Analytical problems in the study of flavonoid compounds in onions. **Food Chem.** v.57, p. 113, 1996.

RUSCHEL, A, P.; HENIS Y SALATI, E. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugar cane seedlings. **Soil Biol. Biochem.** v. 7, p. 181-182, 1975.

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiol. Lett.** v.278, p.1–9, 2008.

SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif*-mutant strains. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v.14, p. 358–366, 2001.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., e MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrilamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SHUKLA, H. D. Proteomic analysis of acidic chaperones, and stress proteins in extreme halophile *Halobacterium* NRC-1: a comparative proteomic approach to study heat shock response. **Proteome Sci.** v. 4, 6, 2006.

SILVA, L.G.; MIGUENS, F.C.; OLIVARES, F.L. *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. **Braz. J. Microbiol.** v. 34, p. 69–71, 2003.

SLAUCH, J. M.; LEE, A. A.; MAHAN, M. J.; AND MEKALANOS, J. J. Molecular characterization of the *oafA* locus responsible for acetylation of *Salmonella typhimurium* O-antigen: OafA is a member of a family of integral membrane trans-acylases. **J. Bacteriol.** v. 178, p. 5904- 5909, 1996.

SOBERÓN, M.; LOPEZ, O.; MIRANDA, J.; TABCHE, M.L.; MORERA, C. Genetic evidence for 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) as a negative effector of cytochrome terminal oxidase *cbb3* production in *Rhizobium etli*. **Mol. Genet.** v. 254, p. 665-673, 1997.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; MACHADO, H. B.; DRUMMOND, M.; YATES, M.G. The N-terminus of the NifA protein of *H. seropedicae* is probably involved in sensing of ammonia. In: **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. TIKHONOVICH, I.A.; NIKOLAI, A.P.; VASSILY, I.R.; WILLIAM, E.N. (eds.) X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, p. 260, 1995.

SPAEPEN, S.; VERSEES, W.; GOCKE, D.; POHL, M.; STEYAERT, J.; VANDERLEYDEN, J. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 189, p. 7626–7633, 2007.

SWAMYNATHAN, S. K.; SINGH, A. *Rhizobium meliloti* purine auxotrophs are *nod*₋ but defective in nitrogen fixation. **J. Genet.** v. 71, p. 11–22, 1992.

TADRA-SFEIR, M. Z.; SOUZA, E. M. et al. Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Appl. Environ. Microb.** v. 77, 2180-2183, 2011.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, p.151-153, 1988.

TASTEYRE, A.; M. C. BARC, et al. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. **Infect. Immun.** v. 69, p.7937-7940, 2001.

TATE, R. L. **Soil microbiology**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 1995. 395p.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W.J.; PRINSEN, E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Mol Plant–Microbe Interact**, v. 17, p.1153–1161, 2004.

TYLER, B. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. **Annu. Rev. Biochem.** v. 47, p. 1127–62, 1978.

URETA, A.; ALVAREZ, A.; RAMON, A.; VERA, M. A.; MARTÍNEZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant Soil**, v. 110, p. 311-319, 1995.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Sci. Soc. Am. J.** v. 56, p. 105-114, 1992.

ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C.M.J. Modulation of host immunity by beneficial microbes. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 25, p. 139-150, 2012.

ZHANG, Y.; MORAR, M. et al. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 3699-3724, 2008.

ZHU, H.; BILGIN, M.; SNYDER, M. Proteomics. **Annu. Rev. Biochem.** v. 72, p. 783-812, 2003.

WALFORD, S. N., Composition of sugarcane juice. **Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.** v.70, p. 265-266, 1996.

WAN, J.; TORRES, M.; GANAPATHY, A.; THELEN, J.; DAGUE, B.B.; MOONEY, B.; XU, D.; STACEY, G. Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 18, p. 458-467, 2005.

WANG, X.; QUINN, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. **Prog. Lipid Res.**, v. 49, p. 97–107, 2010.

WEBER, O.B.; L. M. CRUZ, et al. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Braz. J. Microbiol.** V. 32, p. 201-205, 2001.

WEGER, L. A.; VAN DER VLUGT, C. I. M.; ANDRE H. M.; WIJFJES, A. H. M. et al. Flagella of a Plant-Growth-Stimulating *Pseudomonas fluorescens* Strain Are Required for Colonization of Potato Roots. **J. Bacteriol.** v. 169, p. 2769-2773, 1987.

WHEELER, D.L.; BARRETT, T.; BENSON, D.A.; BRYANT, S.H. et al. Database resources of the National Center for biotechnology information. **Nucleic Acids Research** v. 35, D5-D12, 2007.

WILLCOX, J.K.; CATIGNANI, G.L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. **Crit. Rev. Food Sci.** v. 43, p. 1-18, 2003.

WRIGLEY, G. Tropical agriculture: the development of production. Fourth ed. Longman Inc., New York. 496 pp. 1982.

YAMAGATA, A., KRISTENSEN, D. B., TAKEDA, Y., MIYAMOTO, Y., OKADA, K., INAMATSU, M., YOSHIZATO, K. Mapping of phosphorylated proteins on twodimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. **Proteomics**, v. 2, p. 1267-1276, 2002.

YOUNGQUIST, W., AND DUNCAN, R. C., North American natural gas: data show supply problems: **Nat. Resour. Res.**, v. 12, p. 229–240, 2003.

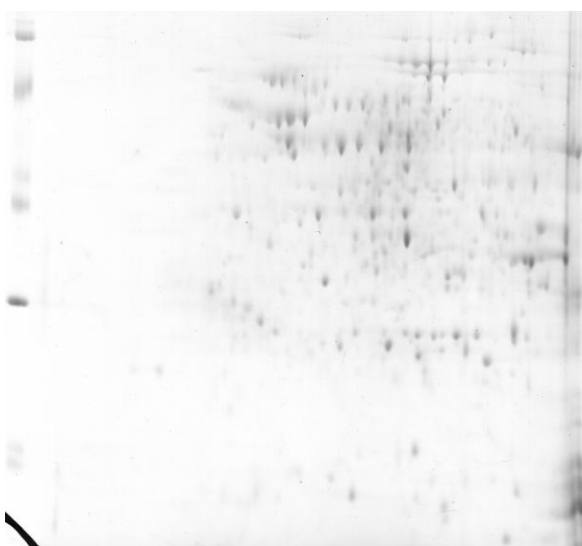
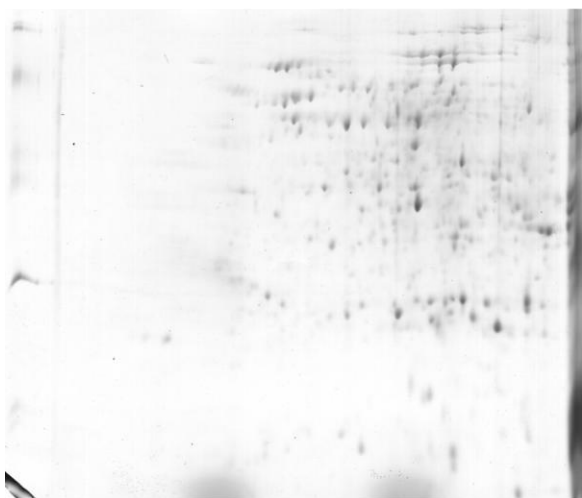
ANEXOS

Proteoma diferencial de raízes de trigo inoculadas por 3 dias com *Azospirillum brasilense*.

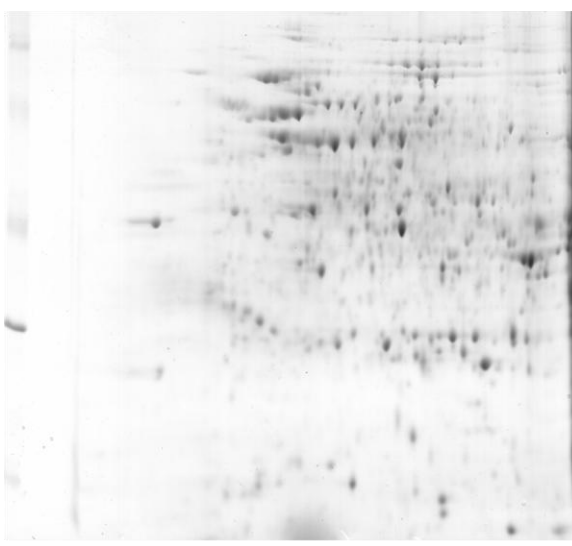
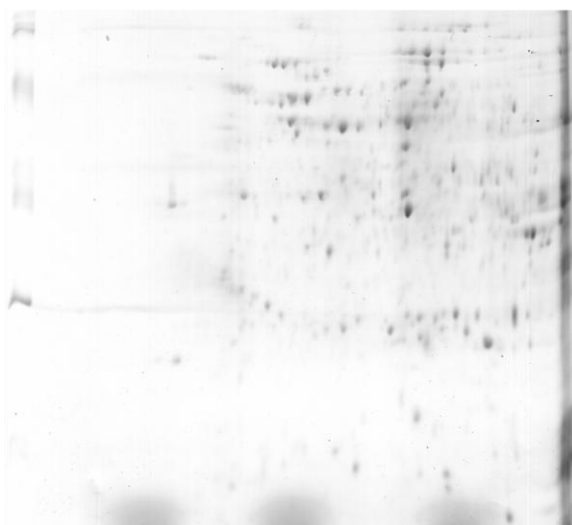
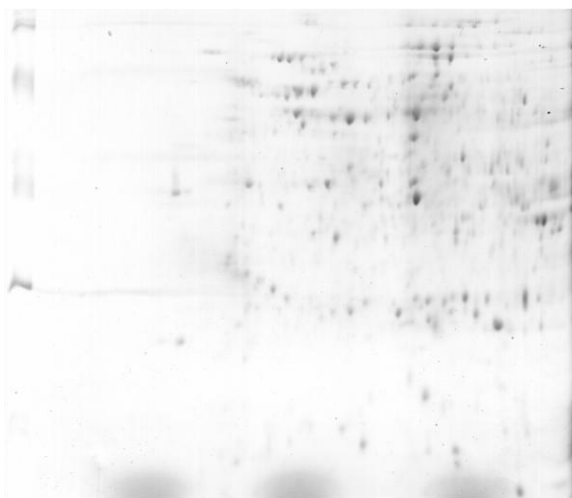
Os objetivos do trabalho foram analisar e identificar as proteínas diferencialmente expressas do trigo quando inoculadas com *A. brasilense* FP2 por 3 dias e construir um mapa 2D de referência de proteínas celulares da raiz de trigo com o maior número possível de proteínas identificadas. As sementes de trigo superficialmente esterilizadas foram transferidas para placas de ágar/água e incubadas a 30 °C por 24 horas. As sementes germinadas foram transferidas para tubos de ensaio (duas por tubo) contendo 25 mL de meio de Hoagland's e incubadas a 25 °C, sob condições de fotoperíodo de 12h luz/12h escuro, (10 cm³ de esferas de polipropileno por tubo de ensaio foram utilizados como suporte para as plântulas). Após 14-16 horas da transferência para os tubos de ensaio as plântulas foram inoculadas na proporção de 1 % (v/v) com solução bactéria de 3x10⁷ UFC/mL. Controles foram feitos utilizando-se os mesmos procedimentos exceto pela inoculação com FP2. Com o intuito de se obter o número de bactérias epifíticas cultiváveis nas raízes de trigo, raízes foram lavadas com água ultra-pura (Milli-Q) estéril. Essas raízes foram acondicionadas em tubo plástico de 2 mL adicionadas de 1 mL de salina (0,9% NaCl) e vortexadas (velocidade máxima) por 1 minuto. As soluções salinas retiradas dos tubos foram diluídas de forma seriada e semeadas em placa contendo o meio de cultivo NFbHP lactato. A colonização das plântulas foi acompanhada diariamente por até 10 dias.

Após três dias de inoculação, as raízes tiveram suas proteínas extraídas e submetidas a isoeletrofocalização e corrida eletroforética bidimensional. Os géis foram analisados no software Imagemaster 6.0 para a detecção das proteínas. Obtenção de 20 proteínas presentes nas raízes inoculadas e ausentes no Ctrl. 15 proteínas com expressão aumentada nas raízes inoculadas, 8 proteínas presentes nas raízes não inoculadas e ausentes nas inoculadas, 10 proteínas com expressão aumentada nas raízes não inoculadas e uma média de 500 bandas protéicas nos géis.

Raízes de trigo não inoculada



Raízes inoculadas com *A. brasilense*



Proteínas identificadas das raízes de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*

ID	Proteína	MW téorico	pI téorico	Score	Cobertura	Peptídeo buscado/pareado	Erro ppm	Aparelho
731	major outer membrane protein OmaA precursor [<i>Azospirillum brasilense</i>]	40986	4,78	68	14%	7/5	200	MALDI
1033	glutathione transferase [<i>Triticum aestivum</i>]	20787	8,56	109	20%	11/7	200	MALDI
695	reversibly glycosylated polypeptide [<i>Triticum aestivum</i>]	29730	6,58	96	26%	11/7	200	MALDI
831	predicted protein [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>]	37430	5,91	141	39%	20/11	180	MALDI
514	CV244968 WS0256.B21_C03 PT-MB-N-A-15 <i>Populus trichocarpa</i> cDNA clone WS0256_C03 3', mRNA sequence	34337	10,9	101	23%	30/12	110	MALDI
833	predicted protein [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>]	29443	5,87	100	29%	11/7	200	MALDI
181	DK495212 <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> mRNA, clone: KALE-L03	29541	9,77	95	44%	52/13	100	Q-TOF
281	CU494873 <i>Theobroma cacao</i> , mRNA sequence AAD7YG10FM1).	11078	5,79	94	28%	31/7	100	Q-TOF
294	GT679683 CA00-XX-CL2-041-B08-BM.F <i>Coffea arabica</i> CL2 <i>Coffea arabica</i> cDNA clone CA00-XX-CL2-041-B08-BM, mRNA sequence	15597	10,54	98	32%	36/6	100	Q-TOF
368	EY798900 CR05-C3-701-069-H07-CT.F Mandarin fruit, development stadium (2 of 3) <i>Citrus reticulata</i> cDNA, mRNA sequence	27250	8,83	98	17%	12/7	80	Q-TOF
449	DV135977 CV03112B2H11.f1 CV03-normalized library <i>Euphorbia esula</i> cDNA clone CV03112B2H11.f1 5, mRNA sequence	26803	5,82	102	22%	15/7	30	Q-TOF
619	FG188898 AGN_PNL214bf1_b11.trimmed.seq AGN_PNL <i>Nicotiana tabacum</i> cDNA 5', mRNA sequence	23940	11,4	100	30%	35/11	60	Q-TOF
696	CB005299 VVC011D05_126628 An expressed sequence tag database for abiotic stressed berries of <i>Vitis vinifera</i> var. Chardonnay <i>Vitis vinifera</i> cDNA clone VVC011D05 5, mRNA	20821	10,37	100	17%	7/6	40	Q-TOF
710	BU889664 P024A06 <i>Populus petioles</i> cDNA library <i>Populus tremula</i> cDNA 5 prime, mRNA sequence.	23587	10,22	96	18%	17/7	50	Q-TOF
760	CA497975 WHE3236_F10_L20ZT Wheat meiotic anther cDNA library <i>Triticum aestivum</i> cDNA clone WHE3236_F10_L20, mRNA sequence.	22598	11,03	96	20%	9/6	100	Q-TOF
819	CA148099 SCEZRZ1016H04.g RZ1 <i>Saccharum hybrid</i> cultivar SP80-3280 cDNA clone SCEZRZ1016H04 5', mRNA sequence	23838	11,91	94	15%	9/6	100	Q-TOF
821	FC024324 CATU24742.fwd CATU <i>Aureococcus anophagefferens</i>	25184	12,4	101	15%	9/6	50	Q-TOF

	Single cell plant material, asexual and sexual stages mixed Aureococcus anophagefferens cDNA clone							
833	CA148099 SCEZRZ1016H04.g RZ1 Saccharum hybrid cultivar SP80-3280 cDNA clone SCEZRZ1016H04 5', mRNA sequence	23838	11,91	95	15%	15/7	100	Q-TOF
1069	60S ribosomal protein L33-B [Zea mays]	11419	10,19	98	50%	13/6	100	MALDI
498	EC749880 POE00006059 PL(light) Polytomella parva cDNA similar to 60S ribosomal protein L31, mRNA sequence.	12650	10,31	129	58%	23/9	200	MALDI
926	EC749880 POE00006059 PL(light) Polytomella parva cDNA similar to 60S ribosomal protein L31, mRNA sequence.	12650	10,31	96	50%	18/6	100	MALDI
974	DW514368 GH_TMIRS_181_F08_F Cotton Normalized Library dT primed Gossypium hirsutum cDNA, mRNA sequence.	24518	9,79	103	35%	37/10	150	MALDI
1020	Calcium-transporting ATPase 2, plasma membrane-type OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os03g0616400 PE=2 SV=1	112818	5,60	60	6%	14/7	100	MALDI
1069	Calcium-transporting ATPase 2, plasma membrane-type OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os03g0616400 PE=2 SV=1	112818	5,60	71	6%	13/7	100	MALDI
498	Enolase 1 OS=Zea mays GN=ENO1 PE=2 SV=1	48265	5,20	66	12%	17/6	150	MALDI
874	ABC transporter I family member 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=ABCI1 PE=2 SV=1	26017	9,82	63	14%	14/5	100	MALDI
974	50S ribosomal protein L12, chloroplastic OS=Nicotiana glauca PE=2 SV=1	19675	5,99	66	29%	36/6	110	MALDI
695	UDP-arabinopyranose mutase 1 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=UAM1 PE=1 SV=1	41844	5,82	58	17%	35/6	200	MALDI
831	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g14470 OS=Arabidopsis thaliana GN=PCMP-A4 PE=2 SV=2	62340	8,79	53	16%	42/7	200	MALDI
178	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 5, chloroplastic OS=Avena fatua GN=ndhF PE=3 SV=1	24135	9,48	58	20%	14/5	60	Q-TOF
181	Vesicle transport v-SNARE 13 OS=Arabidopsis thaliana GN=VTI13 PE=2 SV=1	25124	9,41	60	26%	52/8	100	Q-TOF
294	Putative ABC transporter B family member 8 OS=Arabidopsis thaliana GN=ABCB8 PE=5 SV=1	137710	8,98	60	7%	46/13	100	Q-TOF
368	Homeobox protein LUMINIDEPENDENS OS=Arabidopsis thaliana GN=LD PE=1 SV=2	105578	8,80	64	3%	8/6	100	Q-TOF
368	Carotenoid cleavage dioxygenase 8, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=CCD8 PE=2 SV=1	64544	6,65	57	4%	8/5	100	Q-TOF
368	U-box domain-containing protein 9 OS=Arabidopsis thaliana GN=PUB9 PE=1 SV=1	51760	8,58	58	6%	8/5	100	Q-TOF
544	Probable glutamate dehydrogenase 3 OS=Arabidopsis thaliana	44785	5,75	59	6%	5/4	100	Q-TOF

	GN=GSH3 PE=1 SV=1							
614	6-phosphofructokinase 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=PFK2 PE=1 SV=1	49436	6,63	56	10%	12/5	50	Q-TOF
619	Vesicle transport v-SNARE 13 OS=Arabidopsis thaliana GN=VTI13 PE=2 SV=1	25124	9,41	60	26%	35/6	100	Q-TOF
1033	Probable protein transport Sec1b OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os06g0135900 PE=2 SV=1	75081	7,59	52	9%	39/8	100	MALDI
317	Heat shock cognate 70 kDa protein 1	71712	5,03	61	18%	36/11	200	MALDI
319	40S ribosomal protein S10-1	19549	9,69	55	22%	43/5	200	MALDI
322	RNA-directed DNA polymerase homolog	16960	6,90	50	23%	43/7	200	MALDI
466	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	55624	5,85	109	32%	51/17	200	MALDI
466	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	55595	6,51	85	25%	43/13	200	MALDI
494	Nuclear-pore anchor	237637	5,01	63	5%	21/12	200	MALDI
497	Enolase	48285	5,41	50	15%	24/5	200	MALDI
694	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-3	38798	5,72	64	9%	12/5	100	MALDI
745	Methylthioribose kinase 2	48483	6,18	46	14%	7/4	200	MALDI
498	Putative cell division topological specificity factor OS=Chlorella vulgaris GN=minE PE=3 SV=1	15115	5,15	63	13%	11/4	100	MALDI
1044	AP-1 complex subunit gamma-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=GAMMA-ADR PE=1 SV=1	97220	5,46	69	12%	37/13	200	MALDI
317	Chloroplast envelope membrane 70 kDa heat shock-related protein OS=Spinacia oleracea GN=SCE70 PE=1 SV=3	72150	5,34	63	17%	36/11	200	MALDI
319	40S ribosomal protein S10-1	19549	9,69	55	22%	43/5	200	MALDI
322	RNA-directed DNA polymerase homolog OS=Oenothera berteriana PE=4 SV=1	16763	6,90	64	32%	43/8	200	MALDI
386	Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase 6, chloroplastic OS=Oryza sativa subsp. indica GN=OsI_28171 PE=3 SV=2	47058	7,16	51	10%	24/7	200	MALDI
466	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Phaseolus vulgaris GN=ATPA PE=3 SV=1	55600	6,51	103	26%	51/16	200	MALDI
494	Nuclear-pore anchor OS=Arabidopsis thaliana GN=NUA PE=1 SV=1	237637	5,01	63	5%	21/12	200	MALDI
497	Enolase 1 OS=Zea mays GN=ENO1 PE=2 SV=1	48265	5,41	58	15%	24/6	200	MALDI
694	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-3 OS=Arabidopsis thaliana GN=GLN1-3 PE=1 SV=1	38802	5,72	64	9%	12/5	100	MALDI
976	EM_EST:CK048805; CK048805 43603rsiceh_11694.y1 Oryza sativa cv. PA64s panicle fertile cDNA library Oryza sativa Indica Group cDNA 5', mRNA sequence.	15441	9,10	94	30%	19/5	200	MALDI

999	EM_EST:EY084557; EY084557 CAZI16419.fwd CAZI Artemisia annua normalized leaf library Artemisia annua cDNA clone CAZI16419 5', mRNA sequence.	28300	8,91	103	27%	19/8	200	MALDI
731	Expansin-B10 OS=Zea mays GN=EXPB10 PE=1 SV=2	29845	8,81	59	32%	78/10	200	MALDI
731	abra 19sep08 Contig501 revised	29896	9,28	54	33%	78/11	200	MALDI

Proteínas identificadas por MS2 das raízes de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*

ID	Proteína	MW teórico	pI teórico	Score	Sequência peptídeo	Erro Da
262	Adenosylhomocysteinase OS=Catharanthus roseus GN=SAHH PE=2 SV=1	53769	5,60	32	HSLPDGLMR	0,6
317	Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP70-1 PE=1 SV=3	71712	5,03	33	ATAGDTHLGGEDFDNR	0,6
452	Probable auxin efflux carrier component 4 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=PIN4 PE=2 SV=1	39291	9,38	22	R.WHLSLPGIVTGSLQVMSR.T	0,6
497	Bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4 OS=Arabidopsis thaliana GN=NIT4 PE=1 SV=1	39276	5,48	24	K.IGAAICWENRMPSLR.T	0,6
694	Glutamine synthetase OS=Lactuca sativa PE=2 SV=2	39617	5,24	36	K.EHIAAYGEGNER.R	0,6
1044	Translationally-controlled tumor protein homolog OS=Elaeis guineensis var. tenera GN=TCPT PE=2 SV=1	19212	4,62	25	R.LQEQPAFDKK.Q	0,6
314	Probable mannan synthase 7 OS=Arabidopsis thaliana GN=CSLA7 PE=2 SV=2	64437	9,01	31	K.EGVNITFEIR.D	0,6
701	Formin-like protein 10 OS=Arabidopsis thaliana GN=FM10 PE=1 SV=1	93638	8,77	25	R.DGHYDALGVELLESAR.V	1,0
701	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g53430 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g53430 PE=1 SV=1	115842	5,63	25	R.FNLINGSTPEYYKTAR.L	1,0
525	Cytochrome P450 71A15 OS=Arabidopsis thaliana GN=CYP71A15 PE=2 SV=1	56663	8,38	29	U.R.LKVIETILNGGR.E	0,6
991	Proteasome subunit alpha type-6-A OS=Arabidopsis thaliana GN=PAA1 PE=1 SV=2	27391	5,60	25	R.HITIFSPEGR.L	0,6
1033	Coatomer subunit beta'-1 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os06g0143900 PE=2 SV=1	103736	4,87	22	R.GDIERANDILPSIPK.A	1,0
500	Enolase OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=ENO1 PE=1 SV=2	48285	5,41	41	R.GNPTVEVDVCCSDGTFAR.A	0,6
265	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase OS=Mesembryanthemum crystallinum GN=METE PE=2 SV=1	85054	5,90	33	K.YLFAGVVDGR.N	0,6
315	Probable cyclic nucleotide-gated ion channel 17 OS=Arabidopsis thaliana GN=CNGC17 PE=2 SV=1	84106	8,79	28	R.HRQLPEELR.N	0,6

630	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Solanum tuberosum GN=ICDH-1 PE=2 SV=1	47104	6,54	86	K.TIEAEAAHGTVTR.H	0,6

Proteínas identificadas das raízes de trigo não inoculadas com <i>Azospirillum brasilense</i>								
ID	Proteína	MW teórico	pI teórico	Score	Cobertura	Peptídeo buscado/pareado	Erro ppm	Aparelho
1089	Nucleoside diphosphate kinase 1	16341	6,30	65	19%	9/4	100	MALDI
1089	Nucleoside diphosphate kinase 1	16279	6,42	65	19%	9/4	100	MALDI
1089	EM_EST:CJ682386 CJ682386.1 Triticum aestivum cDNA clone whok8c18 5', Y.Ogihara unpublished cDNA library Wh_OKCS, mRNA sequence.	23032	7,79	150	32%	9/8	100	MALDI
1089	Heat shock protein 81-2 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=HSP81-2 PE=2 SV=1	80435	4,98	56	7%	6/5	100	MALDI
1089	EM_EST:BJ313353 BJ313353.1 Triticum aestivum cDNA clone:whyf4p04, 5' end, single read.	13002	8,93	133	40%	6/6	100	MALDI
482	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=ATPB PE=1 SV=2	59012	5,95	83	19%	14/7	100	MALDI
482	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=ATPB PE=1 SV=2	59012	5,95	79	19%	15/7	100	MALDI
317	Heat shock cognate 70 kDa protein OS=Petunia hybrida GN=HSP70 PE=2 SV=1	71581	5,11	60	13%	12/6	100	MALDI
317	Heat shock cognate 70 kDa protein OS=Petunia hybrida GN=HSP70 PE=2 SV=1	71581	5,11	95	16%	13/9	100	MALDI
317	EM_EST:FL870179 FL870179.1 CCGI11856.b1 CCGI Panicum virgatum etiolated seedlings (H) Panicum virgatum cDNA clone CCGI11856 5', mRNA sequence.	24765	5,50	117	44%	13/8	200	MALDI
471	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (Fragments) OS=Vitis sp. PE=1 SV=1	6430	6,73	75	20%	9/4	200	MALDI
482	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=ATPB PE=1 SV=2	59014	5,95	73	15%	10/6	200	MALDI
482	EM_EST:DR735471 DR735471.1 FGAS081141 Triticum aestivum FGAS: Library 3 Gate 6 Triticum aestivum cDNA, mRNA sequence.	40066	6,40	102	25%	10/7	100	MALDI

482b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=ATPB PE=1 SV=2	59014	5,95	92	19%	12/7	100	MALDI
482b	EM_EST:DR735471 DR735471.1 FGAS081141 Triticum aestivum FGAS: Library 3 Gate 6 Triticum aestivum cDNA, mRNA sequence.	40066	6,40	136	35%	12/9	200	MALDI
498	Enolase 1 OS=Zea mays GN=ENO1 PE=2 SV=1	48265	5,20	60	9%	4/4	100	MALDI
630	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic (Fragment) OS=Medicago sativa PE=2 SV=1	48701	6,15	55	11%	15/5	200	MALDI
315	30S ribosomal protein S14, chloroplastic OS=Zygnema circumcarinatum GN=rps14 PE=3 SV=1	11868	11,15	68	36%	15/5	100	MALDI
315	Phenylalanine ammonia-lyase OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=PAL PE=1 SV=2	76031	6,07	54	7%	9/5	100	MALDI
315	Phenylalanine ammonia-lyase OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=PAL PE=1 SV=2	76031	6,07	54	7%	9/5	100	MALDI
317	Heat shock cognate 70 kDa protein 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=HSC70-2 PE=1 SV=2	71748	5,03	56	10%	15/7	200	MALDI
320	Heat shock cognate 70 kDa protein 1 OS=Solanum lycopersicum GN=HSC-I PE=2 SV=1	71648	5,15	59	8%	4/4	100	MALDI
630	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS=Welwitschia mirabilis GN=atpA PE=3 SV=1	55480	5,92	64	13%	11/6	200	MALDI
1089	Nucleoside diphosphate kinase 1 OS=Mesembryanthemum crystallinum GN=NDKP1 PE=2 SV=1	16341	6,30	65	19%	9/4	100	MALDI
763	fructose-bisphosphate aldolase [Triticum aestivum] EM_EST:CJ783128 CJ783128.1 Triticum aestivum cDNA clone:whatl40e23, 5' end.	27853	5,74	101	28%	8/6	100	MALDI
763	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase, chloroplastic OS=Vigna unguiculata	34909	8,17	55	11%	8/4	80	MALDI

